

**Der Einfluß
von synthetischen Lysolecithin-Analoga
auf das Wachstum
experimenteller Tumoren der Maus**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

vorgelegt von
Walter Bausert
aus Konstanz a. B.

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550803_0046

**Der Einfluß
von synthetischen Lysolecithin-Analoga
auf das Wachstum
experimenteller Tumoren der Maus**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

vorgelegt von
Walter Bausert
aus Konstanz a. B.

1978

Dekan: Prof. Dr. P. Schopfer
Leiter der Arbeit: Dr. habil. P.G. Munder
Referent: Prof. Dr. O. Westphal
Korreferent: Prof. Dr. C. Bresch

Tag der Verkündung des Prüfungsergebnisses: 26.7.1978

Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Munder, P.G., Fischer, H., Weltzien, H.U., Oettgen, H.F.
and Westphal, O.

Lysolecithin analogs: a new class of immunopotentiators
with antitumor activity.

Proc.Am.Assoc.Cancer Res. 17: 174 (1976)

Munder, P.G., Weltzien, H.U., and Modolell, M.

Lysolecithin Analogs: a new class of immunopotentiators
VII. Immunopathology Symposium, Bad Schachen

In: Immunopathology (ed. P.A. Miescher), pp., 411-423
Schwabe & Co. Publishers, Basel/Stuttgart (1976)

Munder, P.G.

In vitro activation of tumoricidal macrophages by alkyl-
lysophospholipids.

In: Cytotoxic cell interaction and immunostimulation
(eds. G. Riethmüller and G. Cudkiewicz) Academic Press,
im Druck



Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde im Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg i.Br. in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. O. Westphal unter Leitung von Herrn Dr. habil. P.G. Munder durchgeführt.

Ich danke

- Herrn Prof. Dr. O. Westphal für die Überlassung eines Arbeitsplatzes, wertvollen Anregungen und das Interesse am Fortgang der Arbeit
- Herrn Dr. habil. P.G. Munder für seine intensive Betreuung durch hilfreiche Diskussionen, weiterführende Impulse und kritische Stellungnahmen während des experimentellen Teils als auch während der schriftlichen Abfassung der Arbeit
- Herrn Dr. H. Schmid für die Einführung in die experimentelle Arbeitsmethodik und seine freundliche Hilfe auch während der Versuche
- Herrn Dr. M. Modolell für seine stete Hilfsbereitschaft
- allen Mitarbeitern und Kollegen im Labor für ihre Assistenz und Ratschläge
- den Herren Dr. H.U. Weltzien, Dr. B. Arnold und Mitarbeitern für die mir zur Verfügung gestellten Lysolecithin-Analoga
- den Herren Prof. Dr. D. Hammer, Dr. H. Mossmann und deren Mitarbeitern für die Hilfe bei der Arbeit in der Versuchstieranlage
- der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. für die Gewährung eines Stipendiums.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
I. <u>Einleitung</u>	3
Immuntherapie des Krebses	3
Therapieformen	4
Aktive spezifische Immunisation	4
Aktive unspezifische Stimulation	6
II. <u>Material und Methoden</u>	12
II.1. Mäuse	12
2. Tumoren	13
2.1. Ehrlich Ascites Karzinom	13
2.2. Myelom X5563	14
2.3. Myelom MPC-11	14
3. Lysolecithine	15
3.1. Natürliches Lysolecithin (LL)	15
3.2. Lysolecithin Analoga (LLA)	16
4. Cyclophosphamid (Cy)	18
5. Eagle's + HEPES Medium	18
6. Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	19
7. Trypsin	19
8. Kolchizin	19
9. Bestimmung der Zellzahl	20
9.1. Tumorzellen	20
9.2. Schafererythrozyten	20

10.	Gewinnung und Aufbereitung von Tumorzellen	20
10.1.	Ehrlich Ascites Tumorzellen	20
10.2.	X5563-Myelomzellen (Trypsination)	23
10.3.	MPC-11-Myelomzellen (Trypsination)	25
11.	Gewinnung von aktivierten PEZ	25
12.	Carbonyleisen/Magnet-Methode	25
13.	Adoptiver Zelltransfer	26
14.	Zellausstriche und Zellfärbung	26
15.	Injektionen	26
16.	Tumormessung	27
16.1.	Ehrlich Ascites Karzinom	27
16.2.	X5563-Myelom	28
16.3.	MPC-11-Myelom	28
17.	Plaque-Test	28
18.	Röntgenbestrahlung	29
III.	<u>Ergebnisse</u>	30
III.1.	Vorversuche mit Ehrlich Ascites Tumorzellen	30
1.1.	EAT-Wachstum in verschiedenen Mäusestämmen	30
1.2.	Schlußfolgerungen aus den Vorversuchen	34
1.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Vorversuche	36
2.	Steigerung der Tumorabwehr durch prophylaktische Gabe von LL und LL _A	46
2.1.	Ehrlich Ascites Tumor	36
	Tumorzellzahl	38
	LL-Dosierung	39
	Variation des Intervalls zwischen LL-Vorbehandlung und Tumorinokulation	40
	Tieralter	43

2.2.	MPC-11-Myelom	49
2.3.	X5563-Myelom	51
3.	Untersuchungen zur Tumorthherapie	53
3.1.	Ehrlich Ascites Tumor	53
	Intravenöse Therapie mit ET-12-X	55
	Intravenöse Therapie mit ET-18-X	58
	Tumorzellzahl	67
	Subcutane Therapie mit ET-18-OCH ₃	71
	Intratumorale Therapie mit ET-18-OCH ₃	73
3.2.	MPC-11-Myelom	76
3.2.1.	Subcutanes Tumorwachstum	76
	Intravenöse Therapie	76
	Intracutane Therapie	79
3.2.2.	Intracutanes Tumorwachstum	84
	Subcutane Therapie	84
	Orale Therapie	86
3.3.	X5563-Myelom	91
	Intravenöse und intracutane Therapie	91
	Orale Therapie	98
4.	Wirkungsmechanismus	100
4.1.	Bedeutung der Antikörper für die Antitumor- wirkung der LLA	101
	Ganzkörperbestrahlung	101
	Cyclophosphamid	106
4.2.	Bedeutung der T-Lymphocyten für die Antitumor- wirkung der LLA	111

4.3.	Bedeutung der Makrophagen für die Antitumor - wirkung der LLA	113
	Ausschaltung der Makrophagen	113
	Carbonyleisen/Magnet-Methode	114
	Phagozytose von Schafererythrozyten	117
IV.	<u>Diskussion</u>	122
V.	<u>Literaturverzeichnis</u>	147

Abkürzungen

BGG	Rinder Immunglobulin G
BSA	Rinder Serumalbumin
Cy	Cyclophosphamid
EAT	Ehrlich Ascites Tumor
EATZ	Ehrlich Ascites Tumorzellen
Fc	kristallisierbares Fragment der Immunglobuline
i.c.	intracutan
IgG	Immunglobulin G
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LL	natürliches Lysolecithin
LLA	synthetische Lysolecithin-Analoga
MER	Methanol-Extrakt-Rest aus Mykobakterien
MethA	Methylcholanthren-induziertes Fibrosarkom der Maus
MG	Molekulargewicht
MPC-11	Merwin Plasmocytom-11
NMRI	Naval Medical Research Institute
PBS	Phosphate-buffered saline = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PEZ	Peritonealexsudatzellen
PFC	Plaque forming cells = antikörperbildende Zellen
RES	Reticuloendotheliales System
rpm	Rotationen pro Minute
s.c.	subcutan
SRBC	Sheep red blood cells = Schafererythrozyten
TZ	Tumorzellen

Zusammenfassung

In drei experimentellen Tumormodellen der Maus (Ehrlich Ascites Karzinom, MPC-11-Myelom, X5563-Myelom) wurden natürliches Lysolecithin und insbesondere seine synthetischen Äther-Analoga auf ihre antitumorale Wirksamkeit in Prophylaxe und Therapie untersucht.

Folgende Ergebnisse sind erreicht worden:

Bei prophylaktischer Anwendung von LL bzw. LLA kann - wie dies ausführlich im Ehrlich Ascites Tumormodell durchgeführt wurde - die Tumorzinzidenz vollkommen verhindert werden. Es zeigt sich hierbei jedoch eine Abhängigkeit von LL- bzw. LLA-Dosierung, chemischer Struktur der LLA, Tieralter, Tumoralast und Intervall zwischen LL- bzw. LLA-Vorbehandlung und Tumorzinzokulation. Der protektive Effekt liegt noch nach einem Zeitraum von 60 Tagen bei 90% der behandelten Tiere vor und ist selbst gegen suprale tale Tumoralasten von 5×10^5 oder gar 1×10^6 EATZ in 70-90% der Tiere vorhanden. Die überlebenden Tiere sind gegenüber dem Tumor hoch immun. Tiere, die nicht überleben, zeigen deutliche Retardierungen des Tumorzinzwachstums.

In alten Tieren (100 Wochen alte NMRI-Mäuse) ist die LLA-Vorbehandlung erfolglos. Es tritt keine Prophylaxe gegen den Tage später überimpften Tumor auf. Die Gründe des Scheiterns sind noch ungeklärt.

Weitere Untersuchungen über den antitumoralen Einfluß der LLA wurden in Gegenwart bereits wachsender Tumorzinztransplantate vorgenommen. Über die getesteten LLA lässt sich sagen, daß neben einer langkettigen Fettsäure, die über eine Ätherbindung am C-1-Atom an das Glyceringerüst gebunden wird, die Substitution am C-2-Atom von ausschlaggebender Bedeutung für den kurativen Effekt ist.

Dies gilt gleichermaßen für den Applikationsweg und die Dosierung der LLA. Auch ist neben diesen Basisparametern der Zeitpunkt des Therapiebeginns und damit eng korrespondierend die Zellzahl des sich etablierenden Tumors von entscheidendem Einfluß auf die antitumorale Kapazität der applizierten LLA.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß gegen experimentell gesetzte Tumoren der Maus mit LLA wirkungsvoll therapiert werden kann. In allen 3 Tumormodellen konnte durch entsprechende Therapie eine deutliche Verschiebung des LD₅₀-Wertes verzeichnet werden. Mehr noch, in allen 3 Tumormodellen resultiert die parenterale oder orale LLA-Therapie, mit der in der Regel 7 Tage nach Tumoringokulation begonnen wurde, in 50-80% Überlebenden. Für die Therapie des EAT ist dies insofern bemerkenswert, da zu diesem Zeitpunkt der Tumor bereits bei einigen Tieren äußerlich sichtbar ist. Trotz dieser hohen Tumormast und späten Therapiebeginns kann dem weiteren Tumorstadium durch i.v. LLA-Applikation Einhalt geboten und der Tumor vollkommen abgestoßen werden. Ähnliches ist bei der Therapie des MPC-11-Myeloms zu beobachten: Tumorknoten, die Durchmesser bis zu 10 mm aufweisen können, zeigen aufgrund der oralen LLA-Gabe Totalregression.

Wie am Beispiel des EAT näher expliziert ist, ist anzunehmen, daß durch die LLA-Therapie offenbar eine bereits angelaufene körpereigene Antwort der Tiere gegen den aufkommenden Tumor verstärkt wird. Ferner ist am Beispiel des EAT demonstriert worden, daß die Antitumorwirkung der LLA durch aktivierte Makrophagen vermittelt wird.

Ein direkter cytotoxischer Einfluß der applizierten LLA auf den Tumor, der die therapeutischen Erfolge erklären könnte, kann ausgeschlossen werden. Nebenwirkungen der LLA-Applikationen während oder nach Behandlungszeit sind - soweit es das äußere Erscheinungsbild und Verhalten der Tiere betrifft - nicht aufgetreten.

I. Einleitung

Immuntherapie des Krebses

Immunologische Aspekte des Krebses wurden bereits Ende des 19. Jahrhunderts in zahlreichen Experimenten untersucht (1-8). Gestützt wurden diese Aspekte durch die Erfolge in der Immuntherapie vieler bakteriell verursachter menschlicher Infektionskrankheiten. Es lag nahe, das Immunsystem auch in die Abwehr gegen Krebs mit einzubeziehen oder es gar dafür hauptverantwortlich zu machen, da man vermutete, daß der Immunapparat ein fundamentaler Abwehrmechanismus des Körpers gegen Krebs darstellt. Schon damals sah man in dieser Funktion sein ursprüngliches biologisches "raison d'être".

In diesem Sinne wurde die Funktion des Immunapparates als protektiver Basismechanismus gegen entgleistes Zellwachstum von Paul Ehrlich 1909 in seiner Schrift "Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung" postuliert: "Ich bin überzeugt, daß aberrierende Keime bei dem kolossal komplizierten Verlauf der fötalen und postfötalen Entwicklung außerordentlich häufig vorkommen, daß sie aber glücklicherweise bei der überwiegenden Mehrzahl der Menschen vollkommen latent bleiben, dank der Schutzvorrichtungen des Organismus. Würden diese nicht bestehen, so könnte man vermuten, daß das Karzinom in einer geradezu ungeheuerlichen Frequenz auftreten würde" (7). Tumorwachstum und Ausbreitung sind demnach die Folgen fehlender oder unzureichender Überwachung durch das Immunsystem. Diese Vorstellung, daß der Immunapparat als Kontroll- und Überwachungsorgan agiert, wurde 1959

wieder von L. Thomas (9) aufgegriffen, von F.M.Burnet in den Jahren 1961 - 1973 umfassend ausgebaut und als "immun-surveillance"-Theorie bekannt (10).

Für eine wirksame Immuntherapie des Krebses muß festgestellt werden, ob neoplastisches Wachstum immunologisch kontrolliert werden kann.

Es muß daher geprüft werden,

1. ob ein Tumor tumorspezifische Antigene besitzt (11-13),
2. ob im Organismus tumorspezifische immunologische Abwehrreaktionen ausgelöst werden (14-17) und
3. ob ein Tumor das immunologische Abwehrsystem durch sogen. "escape" Mechanismen unterlaufen kann (18,19).

Erst das Verständnis dieser immunologischen Phänomene und deren Kontrolle kann zu einer erfolgreichen Immuntherapie des Krebses führen.

Therapieformen

Prinzipiell sind bisher zwei Wege beschritten worden, um die Abwehr des Organismus gegen neoplastisches Wachstum zu steigern:

1. der Organismus wird aktiv spezifisch gegen den jeweiligen Tumor immunisiert und
2. das Abwehrsystem des Tumorstoffs wird aktiv unspezifisch stimuliert.

Aktive spezifische Immunisation

Innerhalb der verschiedenen immunologischen Therapiemöglichkeiten des Krebses (20-23) nimmt die aktive spezifische Immunisation mit den ältesten Platz ein. Als Erste hatten

1902 von Leyden und Blumenthal (2) diese Therapieform bei Patienten mit fortgeschrittenem, metastasierenden Krebs angewandt. Heute stellt sie die am häufigsten benutzte Methode der Tumorummuntherapie dar.

Durch Vakzination mit speziell behandeltem, meist durch Röntgenbestrahlung (24) oder Hitzeeinwirkung (25) stark geschwächtem oder völlig devitalisiertem Tumormaterial soll vor bzw. nach Implantation eines experimentellen Tumors eine aktive, d.h. vom Organismus selbst errichtete tumorspezifische Immunität erreicht werden. Durch wiederholte Injektion an verschiedenen Stellen des Körpers wird das Tumormaterial dem Immunsystem an mehreren Regionen angeboten, was den Effekt der Vakzination erhöhen soll. Auch werden dazu unbehandelte, vitale Tumorzellen als Lebend-Vakzine in einer Dosierung, die gerade noch immunologisch kontrollierbar ist und zur tumorspezifischen Immunität führt, benutzt (26).

Wie die experimentellen Erfahrungen jedoch zeigen, kann die größte Wirksamkeit dieser derartig vorpräparierten Tumorzellvakzine nur in der Präimmunisation (die z.B. 14 Tage vor Setzen des Tumors erfolgte) erzielt werden. Sie sind meist ineffektiv in Gegenwart eines bereits etablierten Tumors.

Wie es die menschliche Tumorsituation zeigt, ist ein Erfolg bei bereits etablierten Tumoren von größtem klinischen Interesse. Dies führte besonders in den vergangenen 30 Jahren zu einer Vielzahl von Untersuchungen, die zum Ziel hatten, die Antigenität der zur aktiven spezifischen Immunisation verwendeten Tumorzellvakzine zu erhöhen (27,28). Mittels enzymatischer (29) oder chemischer (30) Behandlung, sowie durch Anknüpfung hochimmunogener Fremdproteine (28) oder Zellhybridisation (31) wird versucht, die Antigenität der Vakzine in einer mehr effektiveren Form dem Abwehrsystem darzubieten, als es in situ Tumoren und intakte, unbehandelte Tumorzellen vermögen.

In den letzten Jahren konzentrierten sich die Bemühungen auf die Präparation subzellulärer, immunogener Tumorextrakte, insbesondere auf die Solubilisierung von Tumorzellmembranen und die Fraktionierung in immunogene Untereinheiten (32-34). Auch wird versucht, Tumorantigene aus dem Serum (33) bzw. der Ascitesflüssigkeit von Tumoren zu isolieren. Unter der Annahme, daß foetale Antigene zumindest partiell mit tumorspezifischen Antigenen gemeinsame Strukturen haben, wird auch versucht, durch Immunisation mit foetalem Gewebe (onkofoetales Antigen) Immunität gegen Tumoren zu erzeugen (35).

Aktive unspezifische Stimulation

"With the discovery of tumour immunity - that even autochthonous tumours may excite a cell-mediated immune reaction directed against themselves - the focal point of immunological control has changed from immunosuppression to immunopotentiation, and correspondingly the great prize of applied immunology has become to prevention and control at malignant growth". Diese Worte von P. Medawar (36) charakterisieren die Anzeichen einer Wende innerhalb der Tumورimmunologie, die mit den Arbeiten von Gross (11) und Foley (12) in den vierziger- und fünfziger Jahren begann und auch das Interesse der onkologischen Forschung in verstärktem Maße auf die Anwendung von immunologischen Praktiken lenkte, die bereits 1891 W.B. Coley an seinen Tumorphatienten ausführte: Aktive unspezifische Stimulation des Immunsystems gegen Tumorwachstum (37). Aufgrund ärztlicher Beobachtungen und Erfahrungen ist bereits seit über 200 Jahren bekannt, daß sich im Verlauf einer starken bakteriellen Infektion ein gleichzeitig bestehender Tumor zurückbilden kann (38). Gleiches hatte Coley 1891 an einem bereits schon mehrfach erfolglos operierten Krebspatienten festgestellt, der plötzliche Genesung zeigte, nachdem er eine

akute Streptokokkeninfektion durchmachte, die sich in fazialer Erysipelas manifestiert hatte. Diese Tatsache veranlasste Coley lebende Streptokokken-Kulturen zunächst alleine - und später, 1892, - zur Verbesserung der Wirkung in Mischung mit einem anderen bakteriellen Keim (*Bacillus prodigiosus*, heute bekannt als *Serratia marcescens*) seinen an inoperablen Sarkomen erkrankten Patienten zu injizieren (37-40). Er erzielte dabei z.T. außerordentliche Therapieerfolge. So gelang es ihm mit diesem "Coley toxin" erfolgreich ein großes, inoperables Sarkom eines jungen Patienten innerhalb von vier Monaten zu heilen, so daß lebenslange Rezidivfreiheit bestand (41).

Das Abwehrsystem mußte also in irgendeiner Weise infolge dieser gleichzeitigen bakteriellen Infektion stimuliert worden sein und es befähigt haben, den Tumor unter immunologische Kontrolle zu bringen.

In seiner 1934 erschienenen Schrift "Der chronische Reiz des Reticuloendothelialen Systems - eine Krebshemmung" kommt C. Jacobsen zur Schlußfolgerung, "daß akute Infektionskrankheiten mit ihren Folgeerscheinungen und Krebs in vielen Fällen Antagonisten sind". Durch wiederholtes, genau kontrolliertes künstliches Infizieren von Krebspatienten mit bakteriellen Vakzinen (Immunisierung gegen Typhus und Paratyphus) soll das Reticuloendotheliale System in einen chronischen Reizzustand versetzt werden, wodurch dessen antitumorale Reaktionsfähigkeit fortwährend erhalten bliebe. Er sieht im Erreichen des chronischen Reizzustandes des RES nicht nur das Ziel einer aktuellen Krebstherapie, sondern auch in dessen stetem Erhalt eine Prophylaxe gegen Krebs. Aus diesem Grunde ist er der Auffassung, daß die Hoffnung auf Verhütung und Therapie in bakteriellen Vakzinen liegt (42).

Mitte der zwanziger Jahre hatte J.B. Murphy in einer unspezifischen Immuntherapie des Mammakarzinoms der Maus zeigen können, daß die Zahl der überlebenden Tiere nach operativer Entfernung des Karzinoms höher lag, wenn zusätzlich noch das Abwehrsystem der betroffenen Tiere durch Injektionen von Ölsäure stimuliert worden war. 88% der nicht mit Ölsäure behandelten Kontrolltiere starben an erneut gewachsenem Tumor, während hingegen nur 38% der mit Ölsäure therapierten Tiere ein wiederholtes Tumorwachstum zeigten und starben (43). Diese Beispiele machen deutlich, daß durch eine aktive unspezifische Stimulation des Abwehrsystems der tumortragende Organismus durch Verstärkung seines Abwehrsystems in die Lage versetzt wird, sich gegen seinen Tumor zu wehren.

Seither sind in der Tumorummunologie zahlreiche Substanzen unterschiedlichster Herkunft und chemischer Beschaffenheit gebräuchlich geworden, deren antitumorale Adjuvanswirkung in einer Vielzahl von Untersuchungen unter Beweis gestellt werden konnte. Besondere Bedeutung haben dabei u.a. Mykobakterien (BCG) und deren Extrakte (MER), Corynebakterien sowie Endotoxin und seine Derivate (44-48). Sie sind z.T. auch in umfangreichen Studien in der Klinik eingesetzt worden (20-23). Der Wirkungsmechanismus dieser Substanzen ist jedoch noch unklar. Auffällig ist bei allen tierexperimentellen Untersuchungen, daß das Reticuloendotheliale System nach Injektion dieser Substanzen z.T. eine enorme Vergrößerung erfährt. Makrophagen sind dabei die vorherrschende Zellpopulation.

Aufgrund der Tatsache, daß die meisten anorganischen wie auch organischen partikulären Adjuvantien zunächst im Organismus mit Makrophagen in Kontakt kommen und von diesen gefressen werden, wurde in umfangreichen biochemischen Untersuchungen nach einer Veränderung des Zellstoffwechsels

dieser Zellen nach Phagozytose von Adjuvantien gesucht (49-53). Es zeigte sich, daß nach Phagozytose eine Phospholipase A in diesen Zellen aktiviert ist, so daß es zu einer vermehrten Bildung von LL und freien Fettsäuren kommt. Besonders deutlich wurde dies bei Inkubationsversuchen mit adjuvantem silikogenem Quarz, Freund's komplettem Adjuvans und *Corynebacterium parvum*.

Das Reaktionsschema ist in Abb. 1 dargestellt.

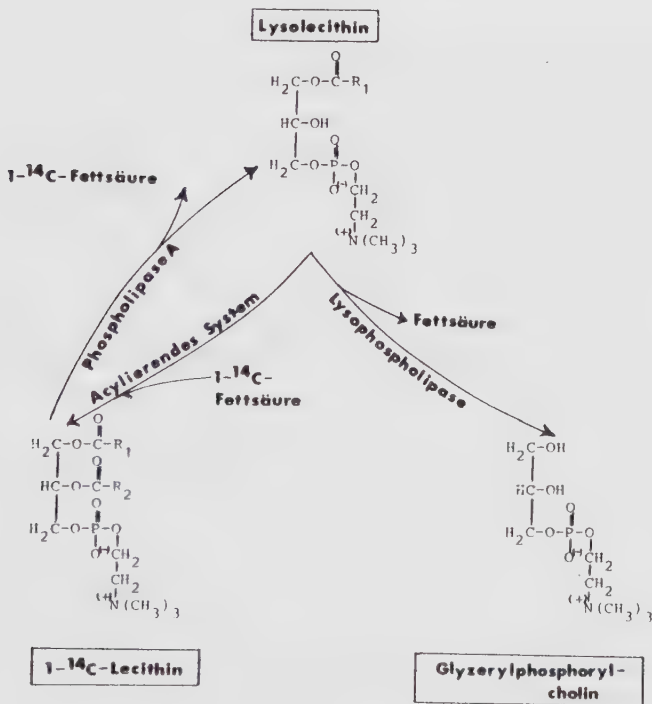


Abb. 1: Phospholipidstoffwechsel modifiziert nach Robertson und Lands (54)

Dies führte zur Arbeitshypothese, daß in der Aktivierung einer intrazellulären Phospholipase A im Makrophagen durch phagozytierte Adjuvantien als auch in der gleichzeitigen entsprechenden endogenen Bildung und Anreicherung von oberflächenaktiven Lysophosphatiden der kleinste gemeinsame Nenner zur Erklärung des Wirkungsmechanismus der meisten Adjuvantien zu finden ist. Wenn also durch Adjuvantien vermehrt Lysolecithin und freie Fettsäuren im Makrophagen gebildet werden, so müßte durch exogen gegebenes Lysolecithin das immunologische System stimulieren.

Tatsächlich konnte in zahlreichen nachfolgenden in vitro- und in vivo-Versuchen ein äußerst starker Adjuvanscharakter von exogen appliziertem Lysolecithin nachgewiesen werden (55-59). Da aber natürliches Lysolecithin rasch metabolisiert wird (60,61), begannen 1967 O. Westphal, H.U. Weltzien, H.J. Eibl und D. Arnold schwer metabolisierbare Lysolecithin-Analoga (LLA) zu synthetisieren (62,63).

Es zeigte sich, daß die Adjuvanswirkung dieser synthetischen Lysolecithin-Analoga stärker ist, als jene des natürlichen Lysolecithins (64).

Nachdem in früheren Untersuchungen festgestellt worden war, daß die humorale Antwort gegen partikuläre (SRBC) als auch lösliche, tolerogene Proteine (BGG und BSA) in vitro und in vivo gesteigert werden konnte (55,56,58,59,65), wurde die Frage gestellt, ob diese Substanzen auch die zelluläre Immunantwort potenzieren können. Unter der Annahme, daß die Abwehr gegen transplantable Tumoren im Tier vor allem durch eine zellvermittelte Immunreaktion ausgelöst wird, wurde die Wirkung von LL und seinen Analoga auf das in vivo-Wachstum verschiedener Tumoren der Maus (Ehrlich Ascites Karzinom, MPC-11-Myelom, X5563-Myelom) untersucht.

Es sollte geklärt werden,

- a) ob die Tiere durch die vorherige Gabe von LL bzw. LLA vor dem Anwachsen des Tumors geschützt und
- b) ob sie nach Setzen des Tumors durch die Applikation von LLA vom Tumor geheilt werden können.

Durch verschiedene Untersuchungsreihen wurde versucht herauszufinden, unter welchen Bedingungen die verschiedenen LLA ihre optimale antitumorale Wirkung entfalten. Es wurden folgende Parameter untersucht: Art der LLA, Dosierung der LLA, Applikationsart der LLA (i.v., i.c., i.p., s.c. und oral), Dauer der Tumorphylaxe, Zeitpunkt des Therapiebeginns, Ort des Tumorstadiums, Alter der Tiere und Tumormenge.

In Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus dieser Substanzen wurde sowohl in vivo wie auch in vitro versucht zu klären, ob bei Applikation von LLA humorale oder zelluläre immunologische Mechanismen für den Schutz vor dem Tumor sowie für die Abstoßung des bereits etablierten Tumors verantwortlich gemacht werden können. Diese Untersuchungsreihen wurden vor allem mit einer Sublinie des Ehrlich Ascites Tumors in NMRI(Han)-Mäusen durchgeführt.

II. Material und Methoden

II.1. Mäuse

Weibliche NMRI(Han)- und Balb/c(Han)-Mäuse wurden vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover-Linden, geliefert.

Um den suppressiven Auswirkungen des Transportstreß auf die Immunantwort (66) der Tiere zu entgehen, wurden neu angelieferte Tiere frühestens nach einer 4-6 tägigen Ruhephase in Versuch genommen.

Für die meisten Ehrlich Ascites Tumorversuche wurden weibliche NMRI(Han)-Mäuse im Alter von 4 - 5 Wochen verwendet, die ein Gewicht von 19-22 g hatten. Das Alter der weiblichen Balb/c(Han)-Mäuse war zu Beginn der Tumorversuche (MPC-11-Myelom) zwischen 7 und 10 Wochen.

Aus institutseigener Tiefenzucht (Bruder x Schwester-Verpaarung) stammten die weiblichen Mäuse des C3Hf-Stammes, die im Alter von 12-16 Wochen für Tumorversuche (X5563-Myelom) verwendet wurden.

Die Vorversuche zum Wachstum des Ehrlich Ascites Tumors wurden mit weiblichen Tieren folgender Mäusestämme vorgenommen:

C3Hf, C57Bl/6, DBA/2, CBA sowie die auf dem genetischen Hintergrund von C3H-Mäusen gezüchteten congenital thymus-defizienten, nackten Nu/Nu- und die phänotypisch "normalen" Nu/+ -Mäuse. Die Tiere stammten aus der Zucht des Max-Planck-Instituts für Immunbiologie, die unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gezüchtet wurden.

Während des Versuches wurden die Tiere unter normalen Bedingungen in Makrolonkäfigen gehalten.

Universalfutter (Hartrollen) und Wasser ad libitum.

2. Tumoren

2.1. Ehrlich Ascites Karzinom

Die Ascitesform des Ehrlich'schen Mäusekarzinoms wurde 1932 von Loewenthal und Jahn zum ersten Mal beschrieben (67). Den Autoren gelang es, dieses bisher nur subcutan in solider Form wachsende Karzinom (ein Mammakarzinom, das 1896 spontan in einer weißen Maus unbekannter Genetik entstand) durch intraperitoneale Passagen in Suspensionsform überzuführen und ohne Impfausfälle weiter zu transplantieren.

Die in dieser Arbeit verwendete Ehrlich Ascites Tumorlinie stammt aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Frankfurt/Main. 1963 ist dieser Tumor von Dr. P.G. Munder im Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg eingeführt worden und wird seither in fortwährenden Passagen in NMRI-Mäusen gehalten (Passagenfrequenz seit 1974: 21 - 23 Tage, 1×10^4 EATZ i.p.).

Dieser Tumor

- besitzt eine aneuploide Chromosomenzahl von 36 - 48, wobei vereinzelt höhere Ploidie-Grade durch offensichtliche Verdoppelung des Chromosomensatzes auftreten. (Die Bestimmung des Ploidiegrades wurde im Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität Freiburg nach (74) in Zusammenarbeit mit Herrn Doz. Dr. W. Vogel durchgeführt.) (Maus: $2n=40$)
- wächst als sogenannter "unspezifischer" Tumor nahezu in allen Mäusestämmen (68,69) (s.Vorversuche S. 30)

- zeigt keine Spontanregression (70)
- wird zu den malignesten experimentellen Mäusetumoren gezählt (71).

2.2. Myelom X5563

Das von Potter und Mitarbeitern im Jahre 1957 erstmals beschriebene Myelom X5563 der Maus gleicht dem menschlichen multiplen Myelom nicht nur im histologischen Bild oder in der Produktion eines abnormen Serumgammaglobulins (IgG_{2a}), sondern auch durch die Ausbildung multipler, osteolytischer Läsionen in den betroffenen Tieren (72, 73). Es kann daher als Laboratoriumsmodell für das klinische Myelom angesehen werden.

Ursprünglich entstand das Myelom X5563 im Intestinum (Ileum/Coecum-Region) einer 22,5 Monate alten weiblichen Maus des Stammes C3H/He/CRGL, bei der Ovariectomie im Alter von 2 Monaten durchgeführt wurde (72,73). 1965 wurde es von Prof. Dr. M. Potter (National Cancer Institute, Bethesda, Md. USA) dem Max-Planck-Institut für Immunbiologie überlassen. Seither wird es in serialen Passagen subcutan in der rechten Axilla von weiblichen C3Hf-Mäusen geführt (Passagenfrequenz: 28-30 Tage, 1×10^5 Zellen).

Der LD_{50} -Wert beträgt für die C3Hf-Maus (Weibchen) 2×10^4 Zellen; die betroffenen Tiere sterben nach 35-45-tägigem Tumorwachstum. Zu diesem Zeitpunkt mißt der Tumor oft mehr als 20 mm im Durchmesser und zeigt zentralnekrotische Areale.

2.3. Myelom MPC-11

1960 wurde das "Merwin plasmacytoma-11" (MPC-11, H87733) bei einer weiblichen Balb/c-Maus entdeckt, bei der eine intraperitoneale Fremdkörperimplantation (Millipore

Filter) vorgenommen worden war (75). Es synthetisiert wie das Myelom X5563 ein Protein vom γ -Typ (IgG_{2b}) (76). Das in dieser Arbeit verwendete MPC-11-Myelom wurde 1975 von Dr. Noel Warner (The Walter and Eliza Hall Institute, Melbourne, Australien) dem Max-Planck-Institut für Immunbiologie zur Verfügung gestellt und seither in weiblichen Balb/c(Han)-Mäusen durch subcutane Transplantation in die Axilla in Passage gehalten (Passagenfrequenz: 18 - 21 Tage, 1×10^5 Zellen). Der LD₅₀-Wert beträgt für die weibliche Balb/c(Han)-Maus 5×10^3 Zellen subcutan oder intracutan; die betroffenen Tiere sterben nach 35 - 40-tägigem Tumorstadium. In diesem Stadium beträgt der Tumordurchmesser oft mehr als 20 mm.

3. Lysolecithine

3.1. Natürliches Lysolecithin (LL)

Natürliches Lysolecithin (LL) wurde in Trockenform von der Firma Carl Roth, Karlsruhe (W-Germany), bezogen und bei +4°C im Exsikkator aufbewahrt. Für die Versuche wurden jeweils 100 mg LL mit 50 ml PBS gelöst und mit einer Titan-Mikrospitze für 10 Sekunden auf Schallenergiestufe 4 mit dem Branson Sonifier Ultraschall-Desintegrator (Modell Nr. S125, Branson Instruments, Danbury, Connecticut, USA) in Eiswasser beschallt. Abgefüllt in Falcon Röhrchen (Falcon 2001) wurde das gelöste Lysolecithin bei -20°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Für eine Reihe von Versuchen wurde natürliches Lysolecithin selbst hergestellt. In Anlehnung an die Methode von Small (77) wurde das aus Hühnereigelb gereinigte Lecithin durch Phospholipase A₂ des Naja naja Schlangengifts (Sigma Chemical Comp. No. V9125, St. Louis, USA) zu Lysolecithin gespalten (55). Dieses LL ist dünn-schichtchromatographisch rein.

3.2. Lysolecithin Analoga (LLA)

Lysolecithin Analoga wurden von Prof. O. Westphal und Mitarbeitern seit 1967 synthetisiert (62,63). In Abb. 2 ist das Molekül des natürlichen Lysolecithins aufgezeichnet und jene Strukturen mit den Positionen 1, 2 und 3 bezeichnet, die chemisch verändert wurden.

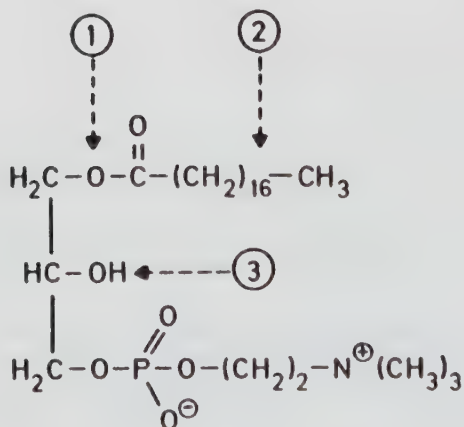


Abb. 2: Natürliches Lysolecithin

In Position 1, 2 und 3 wurde das Molekül verändert

In Position 1 wird die Esterbindung (ES) der Fettsäure an das Glyceringerüst durch eine Ätherbindung (ET) ersetzt.

In Position 2 ist die Anzahl der Kohlenstoffatome im Alkylrest am C-1-Atom und damit die Kettenlänge der Fettsäure verkürzt oder verlängert worden.

In Position 3 erfolgte die Substitution der Hydroxylgruppe am C-2-Atom durch andere Reste.

Diese chemischen Veränderungen gehen ein in die für diese Lysolecithin-Analoga verwendeten Abkürzungen. Zum Beispiel bedeuten in der Abkürzung für das C-18-Ätherlysolecithinmolekül die Symbole

ET	- 18 -	OCH ₃
Ätherbindung in Position 1	Anzahl der C- Atome (Ketten- länge in Pos.2)	Substitution in Position 3 (Das C-2-Atom wird durch die O-Methylgruppe für eine Acylierung zu Lecithin blockiert)

In dieser Arbeit wurden folgende LLA auf ihre antitumorale Wirksamkeit in vivo untersucht:

Äther-LLA mit 12 C-Atomen:

		MG
ET-12-H	(1-dodecyl-propandiol-3-phosphorylcholin)	427.57
ET-12-OH	(Rac-1-dodecyl-2-glycero-3-phosphorylcholin)	443.57
ET-12-OCH ₃	(Rac-1-dodecyl-2-methoxy-3-phosphorylcholin)	457.60
ET-12-O-Benz	(Rac-1-dodecyl-2-O-benz-3-phosphorylcholin)	533.70

Äther-LLA mit 18 C-Atomen:

		MG
ET-18-H	(1-octadecyl-propyndiol-3-phosphorylcholin)	511.73
ET-18-OH	(Rac-1-octadecyl-glycero-3-phosphorylcholin)	527.73
ET-18-OCH ₃	(Rac-1-octadecyl-2-methylglycero-3-phosphorylcholin)	541.76
ET-18-Benz	(Rac-1-octadecyl-2-O-benz-3-phosphorylcholin)	617.86
ET-18-PN	(Rac-1-octadecyl-phoyphorylcholin)	463.65

Diese Substanzen wurden bei 4°C im Exsikkator aufbewahrt. Die Lösung und Aufbewahrung in PBS erfolgte wie bei natürlichem Lysolecithin (s. 3.1., S. 15).

4. Cyclophosphamid (Cy)

Cyclophosphamid (N,N-Bis-(2-chloräthyl)-N,O-propylenphosphorsäure-ester-diamid, Endoxan) wurde von den ASTA-Werken AG, Brackwede/Westfalen (W.-Germany) als Trockensubstanz bezogen.

Die Injektionslösungen wurden frisch angesetzt und unmittelbar nach Fertigstellung in Konzentrationen von 1000 - 4000 µg/Maus intravenös gespritzt.

5. Eagle's + HEPES Medium

Ansatz für 5 Liter: Dulbecco's modified Eagle modified (Grand Island and Biological Company, New York) + 12 g HEPES Puffer (N-2 Hydroxyäthylpiperazin-N-2-äthansulfonsäure, Fa. Carl Roth, Karlsruhe), Einstellung auf pH 7.2.

Das fertige Medium wurde anschließend durch 3 hintereinander liegende Filter verschiedener Porengröße (0.22 µm, Millipore, Bedford Mass. USA; 0.45 µm Selektion Filter Typ BA85; 1.2 µm Selektion Filter Typ ST69, Fa. Schleicher & Schüll, 3354 Dassel, W.-Germany) filtriert und bis zum Gebrauch bei + 4°C aufbewahrt.

6. Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

Ansatz für 5 Liter:

Es werden

43.85 g NaCl

1.10 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

11.95 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$

in 5 Liter aqua bidest. gelöst. Der pH-Wert wird mit 5 N NaOH auf 7.2 eingestellt.

Die Lösung wurde anschließend durch 3 hintereinanderliegende Filter (s. 5.) filtriert und bis zum Gebrauch bei + 4°C aufbewahrt.

7. Trypsin

Trypsin-Trockensubstanz 1 : 250 (Rinderpankreastrypsin)

Aufbewahrung bei 4°C (Serva, Heidelberg 37290)

Ansatz:

8.00 g NaCl

0.40 g KCl

1.00 g Dextrose

0.35 g NaHCO_3

2.10 g Trypsin 1 : 250

Auf 1000 ml aqua bidest. auffüllen, im Kühlraum abgedeckt über Nacht rühren lassen, durch Vorfilter (normales Filterpapier) giessen und mit 0.22 μm Milliporefilter filtrieren. Danach bei -20°C bis zum Gebrauch einfrieren.

8. Kolchizin

Für die Bestimmung des Ploidie-Grades der Ehrlich Ascites Tumorzellen fand Kolchizin in der Konzentration von 4 $\mu\text{g/g}$ Maus i.p. oder s.c. Anwendung.

Kolchizin, krist. reinst, Lösung in PBS (E.Merck AG, Darmstadt)

9. Bestimmung der Zellzahl

- 9.1. Tumorzellen (EATZ, MPC-11, X5563) oder PEZ wurden im Mikroskop (Zeiss, Phasenkontrast, 200-fache Vergrößerung) auf einer Bürkerzählkammer (Tiefe 0.1000 mm, 0.0025 mm^2 , 0.04 mm^2) ausgezählt und die Zellzahl pro 1 cm^3 ($= 1 \text{ ml}$) mit Angabe des prozentualen Anteils trypanblaupositiver (toter) Zellen bestimmt.

Trypanblaulösung: Eine 0.2%ige wässrige Trypanblau-stamm-lösung (Serva 37252) wird 1 : 5 mit 4.25%iger NaCl-Lösung verdünnt. Diese Lösung wird im Verhältnis von 1 : 1 mit der Zellsuspension versetzt.

9.2. Schaferythrozyten

Etwa 10 ml Schafblut werden steril aus dem Bio-Pack-ACD-Blutbeutel entnommen und 2 - 3 mal in PBS bei 2000 rpm für 7 min in der Kühlzentrifuge gewaschen, so daß ein hämoglobinfreier Überstand resultiert, der verworfen wird. Zur Zellzählung werden 40 μl der Schaferythrozyten-suspension mit 20 ml Isoton-II-Lösung (Coulter Electronics) verdünnt und anschließend davon 0.5 ml im Zellzähl-gerät (Coulter Counter, Model D_N , Coulter Counter Elec-tronics Ltd., Dunstable, Bds. England) gezählt. Die Stammlösung wird mit PBS auf die geforderte Zellzahl/ml eingestellt.

10. Gewinnung und Aufbereitung von Tumorzellen

10.1. Ehrlich Ascites Tumorzellen

Für die EAT-Versuche wurden in der Regel gepoolte Tumor-zellen aus 3 weiblichen NMRI-Passagetieren verwendet, denen 21 - 23 Tage zuvor 1×10^4 EATZ i.p. inokuliert wurden.

Die Gewinnung dieser 21 - 23 Tage "alten" Tumorzellen wurde unter sterilen Bedingungen wie folgt durchgeführt:

1. Tötung der Maus mit Stickstoff-Gas.
2. Desinfektion der Bauchseite mit 70%igem Alkohol.
3. Anheben des Fells mit Pinzette, kurzer Einschnitt mit medianer Schnittführung (Knopfschere) bis kurz vor Processus xiphoideus des Sternums.
4. Caudal, rechts und links des medianen Schnitts durch kleinere Einschnitte die Haut (Fell) entfernen, indem sie jeweils nach vorne oben mit chirurgischer Pinzette gezogen und mit Nadeln festgesteckt wird. Die Bauchdecke darf nicht gespannt sein.
5. 5 ml Eagle's + HEPES Medium mit Kanüle der Größe 1 oder 2 injizieren, aspirieren und reinjizieren, wobei mit dem Finger die Flanken leicht massiert werden sollten, um den Spüleffekt zu erhöhen.
6. Das injizierte Medium kann jetzt zusammen mit dem in Suspensionsform vorliegenden Tumor durch gleiche Spritze abgezogen und in Zentrifugationsgefäße übergeführt werden. Dabei Kanüle von Spritze entfernen und langsam, ohne Schaumbildung den Spritzeninhalt an der Gefäßinnenseite in das Gefäß fließen lassen. In den Zentrifugationsgefäßen (Sorvall-Becher) sind 20 - 30 ml eiskaltes Eagle's + HEPES Medium bereits vorgelegt, um die Gerinnung des Exsudates zu verhindern. Es zeigte sich, daß durch hochvolumiges Resuspendieren mit Eagle's + HEPES Medium das Verklumpen der Zellen verhindert werden kann. Die Zugabe von Heparin (5 Einheiten/ml; Serva, Heidelberg) bzw. Liquemin (5 Einheiten/ml, Hoffmann La Roche AG, Grenzach) oder Verwendung von Calcium/Magnesium-Ionen-freiem PBS hatte dagegen nur wenig Erfolg.

Je nach benötigter Tumorzellzahl können die unter 5 und 6 beschriebenen Vorgänge noch 3 - 4 mal wiederholt werden.

7. Zentrifugation der Zellen bei 2000 rpm für 7-10 Minuten in der Kühlzentrifuge (+ 4°C).
8. Verwerfen des Überstandes.
9. Leichtes Aufklopfen der Zellen des Sediments und hochvolumiges Resuspendieren (30-40 ml) mit Eagle's + HEPES Medium. Liegt starke Hämorrhagie vor: Vor Resuspension in Eagle's + HEPES Medium Hämolyse mit 20 ml 0.2% NaCl für 30 sec., Neutralisation mit 20 ml 1.6% NaCl.
10. Erneutes Zentrifugieren (waschen): 2000 rpm, 7-10 min., 4°C.
11. Schritte 8 und 9 wiederholen, zum 3. Mal (= letztes Mal) zentrifugieren.
12. Resuspension in 10 ml Eagle's + HEPES Medium.
13. Bestimmung des prozentualen Anteils lebender bzw. toter Tumorzellen im Phasenkontrastmikroskop mit Neubauer-Zählkammer durch den Trypanblau-Vitalitätstest. Der Anteil trypanblau-positiver Zellen betrug in der Regel 10-15%.
14. Einstellen der gewünschten Tumorzellzahl pro ml.

10.2. X5563-Myelomzellen (Trypsination)

Die Aufbereitung des solide wachsenden Myeloms X5563 wurde in Anlehnung an die Methode von Heidelberger und Mitarbeitern (78) unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

1. Tötung der Tumormäuse mit Stickstoff-Gas.
2. Desinfektion des Fells um den Tumor mit 70% Alkohol.
3. Periphere Schnittführung mit Knopfschere um den Tumor, so daß sich das Fell mit Pinzette abziehen lässt und der Tumor frei liegt.
4. Präparations-Besteck wechseln: Exstirpation des Tumors und Überführung in Petrischale; hämorrhagische bzw. nekrotische Teile abtrennen und verwerfen.
5. Mit Rundschere: Zerkleinern des Tumors (unter Zugabe von 5 ml kaltem PBS), bis nach 3-5 Minuten Tumorzellbrei vorliegt.
6. Überführung des Tumorzellbreis in Erlenmeyerkolben mit 40 ml kaltem PBS und sterilem Magnetrührer; 8-10 Minuten leicht rühren.
7. Sedimentation des Tumorzellbreis für 2 Minuten, anschließend Überstand mit Wasserstrahlpumpe absaugen.
8. 1. Trypsination: zum sedimentierten Tumorzellbrei werden 40 ml sterile 0.25%ige Trypsinlösung (die bereits auf 37°C vorgewärmt wurde) gegeben; bei 37°C im Wasserbad für 8-10 Minuten leichtes Rühren.
9. Sedimentation des Tumorzellbreis für 2 Minuten, anschließend Überstand mit Wasserstrahlpumpe absaugen.
10. 2. Trypsination: zum sedimentierten Tumorzellbrei werden ebenfalls wieder 40 ml Trypsinlösung (0.25%, steril, auf 37°C vorgewärmt) gegeben; bei 37°C im Wasserbad für 30 Minuten etwas stärker rühren lassen.

11. Die Trypsination wird nach 30 Minuten durch Zugabe von 10%igem foetalem Kälberserum (Fa. Gibco, Merkeley, USA) gestoppt. Die Suspension wird durch ein Metallsieb der Maschengröße 0.25 mm in ein steriles Zentrifugengefäß (500 ml Sorvall-Becher) überführt.
12. Nach Unterschichten mit 15 ml inaktiviertem foetalem Kälberserum wird bei 1 200 rpm in der Kühlzentrifuge zentrifugiert.
13. Überstand dekantieren, Sediment leicht aufklopfen:
 - falls stark hämorrhagisch: Hämolyse durch 0.2% NaCl (20 ml) für 30 sec; Isotonie durch 1.6% NaCl (20 ml), Zugabe von 40 ml Eagle's + HEPES Medium.
 - liegt keine Hämorrhagie vor: Resuspension in 80 ml Eagle's + HEPES Medium
 - falls Verklumpungen: durch sterile Gaze (Fa. Beiersdorf, Hamburg) oder steriles Metallsieb filtrieren.
14. 2. Zentrifugation: 1 200 rpm, 7 Minuten, Kühlzentrifuge Sorvall.
15. Überstand dekantieren, Sediment leicht aufklopfen und resuspendieren in 10 ml Eagle's + HEPES Medium. Bei Verklumpungen der Zellen nochmals durch sterile Gaze oder Sieb gießen.
16. Mikroskop: (Zeiss, Phasenkontrast, 200-fache Vergrößerung): Bestimmung der Zahl lebender Tumorzellen/ml mit Bürkerkammer unter Angabe der trypanblaupositiven (toten) Tumorzellen.
17. Einstellen der geforderten Tumorzellzahl pro gewünschtes Volumen.

Bei dieser Aufbereitungsmethode liegt der Anteil trypanblaupositiver (toter) Tumorzellen zwischen 5 und 15 %.

10.3. MPC-11-Myelomzellen (Trypsination)

Die Überführung des soliden MPC-11-Tumorgewebes in eine Einzelzellsuspension wurde nach der unter 10.2., Schritte 1-17, beschriebenen Dispersionsmethode durchgeführt.

11. Gewinnung von aktivierten PEZ

Die intraperitoneale Injektion von 2 mg LL bzw. LLA wird von der Maus mit der Bildung eines zellreichen Peritonealexsudates beantwortet. 4 Tage nach der Injektion von LLA wird das zellreiche Exsudat (PEZ) wie unter 10.1. (S.20) beschrieben, gewonnen. Die Zellen werden 1 - 2 mal gewaschen (1 500 rpm, 10 Minuten) und auf die gewünschte Konzentration/ml eingestellt.

12. Carbonyleisen/Magnet-Methode

Die Carbonyleisen-Behandlung von Peritonealexsudatzellen wurde wie folgt durchgeführt:

1×10^7 PEZ wurden mit gleichem Volumen einer Carbonyleisensuspension (lymphocyte separating agent, Technicon Comp. Frankfurt, W-Germany) in Falcon-Röhrchen für 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad unter Aufschütteln inkubiert. Die PEZ eines jeden Tieres wurden getrennt inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden sie in ihren Falconröhrchen auf einen starken Magnet gesetzt. Nach 5 Minuten konnten die einzelnen Überstände abgesaugt und für 7 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert werden. Das Sediment enthielt

bei morphologischer Kontrolle eisenhaltige Phagozyten (Makrophagen) und freie Eisenpartikel. Das Sediment wurde verworfen.

Der abzentrifugierte Überstand wurde in Eagle's + HEPES Medium resuspendiert und erneut mit Carbonyleisen versetzt. Nach erneuter Inkubation und Magnetbehandlung wurden die carbonyleisenfreien Überstände sofort in normale Empfängertiere i.p. gespritzt. Zwei Stunden später wurden diese Tiere mit 1×10^4 Ehrlich Ascites Tumorzellen inokuliert.

13. Adoptiver Zelltransfer

Zur Untersuchung der Frage, welche immunkompetenten Zellen bei der Tumorabwehr beteiligt sind, wurden adoptive Zelltransferexperimente durchgeführt. Aktivierter PEZ wurden wie in 10.1 (S.20) für EATZ beschrieben, gewonnen und anschließend bei 1 500 rpm für 10 Minuten in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Danach erfolgte die Einstellung der Zellzahl pro ml. Die Zellvitalität wurde mit Trypanblau kontrolliert. Unmittelbar nach Beendigung der in vitro-Behandlung (Inkubation mit Carbonyleisen oder Schaferythrozyten) wurden die Zellen in unbehandelte Empfängertiere intraperitoneal gespritzt.

14. Zellausstriche und Zellfärbung

Die Methode der Zellausstriche sowie Zellfärbung wurde nach Hallmann (81) durchgeführt.

15. Injektionen

intraperitoneal

Natürliches Lysolecithin und Lysolecithin-Analoga als auch EATZ wurden in einem Volumen von 1 ml/Maus i.p. injiziert (Kanülengröße 12).

Intravenös

LLA wurden in einem Volumen von maximal 0.5 ml mit Kanülen der Größe 20 in den Schwanz injiziert. Die maximale Konzentration an LLA betrug 100 µg/0.5 ml. Vor der Injektion wurden die Mäuse für 3 - 5 Minuten mit Hilfe einer Infrarotlampe überwärmt.

Subcutan/Intracutan

LLA und Tumorzellen (MPC-11 und X5563) wurden s.c. bzw. i.c. in einem Volumen von 0.1 - 0.2 ml injiziert (Kanülengröße 20). Die Tiere wurden vorher im Injektionsbereich rasiert.

Oral

LLA wurden mit Hilfe einer Schlundsonde für Mäuse der Fa. Popper & Sons, New Hyde Park, N.Y., USA, appliziert.

16. Tumormessung

16.1. Ehrlich Ascites Karzinom

Ag = Gewichtszunahme der Tiergruppe gegenüber Tag 0
in Gramm (Tag 0 = Tag der Tumorinokulation)

Tierwaage: Mettler-Waage, Typ K 7T

16.2. X5563-Myelom

Das Myelom X5563 wurde stets in die rechte Achselregion transplantiert. Die Tumormessung erfolgte deshalb durch Palpation, wobei für

-	=	kein Tumor palpabel
+	=	Tumor $\varnothing$ bis 5 mm
++	=	Tumor $\varnothing$ bis 10 mm
+++	=	Tumor $\varnothing$ bis 20 mm
++++	=	Tumor $\varnothing$ $\gt$ 20 mm

festgelegt wurde.

16.3. MPC-11 Myelom

Bei subcutanem Wachstum in der Achselregion:

Tumormessung wie bei 16.2 aufgeführt.

Bei intracutanem Wachstum ventral: Mit einer Spezialschieblehre (Dial, Typ 6921, Schweiz) wurden Länge und Breite bestimmt.

Der Mittelwert beider Größen wird als Tumordurchmesser angesehen.

17. Plaque-Test

Der Nachweis antikörperbildender Zellen wurde wie in (79) beschrieben in Anlehnung an die Methode von Cunningham (80) durchgeführt.

18. Röntgenbestrahlung

Die subletale 450 R Ganzkörper-Röntgenbestrahlung von NMRI-Mäusen wurde mit einem 300 KV-Röntgengerät (Müller MG 300, C.H.F. Müller AG, Hannover) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Spannung 230 KV, Röhrenstrom 12 mA, Focusabstand (FA) 50 cm, Halbwertschicht (HWS) 0.5 mm Cu, Al-Filter 6.0 mm, Dosisleistung 72 R/min.

Die Bestrahlungen wurden jeweils mit 10 NMRI-Mäusen durchgeführt, die in einem speziell angefertigten runden Bestrahlungsgehäuse ($\varnothing$ 19 cm) aus Plexiglas Platz fanden.

III. Ergebnisse

III.1. Vorversuche mit Ehrlich Ascites Tumorzellen

1.1. EAT-Wachstum in verschiedenen Mäusestämmen

Es ist bekannt, daß sich das Ehrlich Ascites Karzinom in fast allen Mäusestämmen erfolgreich transplantieren lässt (68,69). Diese weite Homotransplantabilität wird darauf zurückgeführt, daß sich die Wirtsspezifität dieses Impfkarcinoms während seiner langen Transplantationsgeschichte von über einem halben Jahrhundert durch Selektionsdruck erheblich vermindert hat und infolgedessen als sogen. "unspezifischer Tumor" zu einem der malignesten Mäusetumoren geworden ist (71).

Transplantations- und Immunisationsversuche deuten daraufhin, daß dieser Tumor jedoch immungenetisch nicht völlig indifferent ist und "allograft"-Reaktionen seitens des Wirts hervorzurufen vermag (24,82,83).

Tabelle 1: Intraperitoneales Wachstum verschiedener Zellzahlen des Ehrlich Ascites Tumors in verschiedenen Mäusestämmen *

STAMM	INOKULIERTE TUMORZELLZAHL											
	1x10 ⁰	1x10 ¹	1x10 ²	1x10 ³	1x10 ⁴	5x10 ⁴	1x10 ⁵	2x10 ⁵	5x10 ⁵	1x10 ⁶	2x10 ⁶	5x10 ⁶
NMRT (HAN)	20**	37	92	96	100	100	100	100	100	100	100	100
BALB/c	0	0	0	0	0	30	70	70	80	100	100	100
C3Hf	0	0	0	0	0	10	10	75	100	100	100	100
DBA/2	0	0	0	0	0	0	10	75	100	100	100	100
C57BL/6	0	0	0	0	0	0	0	0	10	30	60	100
Nu/+	N.G.***	0	0	N.G.	0	N.G.	60	70	70	80	100	100
Nu/Nu	0	0	0	N.G.	0	N.G.	40	60	N.G.	83	100	100
CBA	N.G.	N.G.	N.G.	N.G.	N.G.	N.G.	0	N.G.	N.G.	60	N.G.	N.G.

* = AUFSTELLUNG 35 TAGE NACH INOKULATION DER TUMOREN

** = TUMORWACHSTUM IN 0/0 DER TIERE

*** = NICHT GETESTET

Wie Tabelle 1 zeigt, liegen in einer vergleichenden Transplantationsstudie innerhalb verschiedener Mäusestämme enorme quantitative Unterschiede in der Transplantierbarkeit dieses Tumors vor. Die inokulierte Tumormenge, die ein Angehen des Tumors in 50% der Fälle garantiert (LD_{50} -Wert), schwankt zwischen $< 10^2$ und 1×10^5 EATZ. Man sieht, daß die verwendete EAT-Sublinie bereits mit einer Zellzahl zwischen 10 und 100 Zellen in 50% der Fälle in NMRI-Mäusen i.p. letal angeht ($LD_{50} < 10^2$). Daraus ergibt sich, daß diese Sublinie des Ehrlich Ascites Karzinoms außerordentlich maligne für die NMRI-Maus ist, da selbst eine Tumorzelle in 20% der Fälle das betroffene Tier töten kann.

Dies ist in keinem der getesteten Mäusestämme bei dieser Zellzahl beobachtet worden. Auch 10, 100 oder 1000 Tumorzellen werden erfolgreich abgestoßen. Selbst 10 000 EATZ, die für NMRI-Mäuse den absolut sicheren Tod innerhalb 3 - 4 Wochen bedeuten, gelangen nicht zur Proliferation. Trotz dieser geringen Zellzahlen gelingt es dem Tumor nicht, die immunologische Kontrolle dieser Tiere zu unterlaufen, es findet kein "sneaking through" statt (18). Erst ab 100 000 Tumorzellen kann im Balb/c- und Nu/+-Stamm ein letales Angehen des Tumors in mehr als 50% der Fälle beobachtet werden. Bei den anderen Mäusestämmen kann der Tumor erst ab einer Zellzahl von 2×10^5 nicht mehr durch eine spezifische zelluläre Immunreaktion unter Kontrolle gehalten werden, er wächst in den meisten Tieren (Tabelle 1). Eine 100%ige Letalität ist in allen der hier verwendeten Mäusestämme erst bei einer Zellzahl von 5×10^6 zu erreichen. Dies deutet daraufhin, daß das Ehrlich Ascites Karzinom gegen diese Stämme starke Transplantationsantigene aufweist. Interessant ist, daß die schwarze C57Bl/6-Maus die größte Resistenz zeigt, während die weiße Balb/c-Maus in ihrer Anfälligkeit gegenüber dem Ehrlich Ascites Tumor der ebenfalls weißen NMRI-Maus am nächsten kommt. Unter

der Annahme, daß bei den meisten Impftumoren, seien sie nun stark oder schwach immunogen, eine Zellzahl von 1×10^4 notwendig ist, um ein Tier zu immunisieren, kann aufgrund dieser Tabelle festgestellt werden, daß es unterhalb dieser Zellzahl nur bei der NMRI-Maus zum "sneaking through" kommt, d.h., auch niedrigere Zellzahlen führen zu letalem Tumorwachstum. Wie später in Tabelle 4 (S.39) gezeigt wird, lässt sich tatsächlich mit diesen geringen Tumorzellzahlen in der NMRI-Maus keine Immunität auslösen, denn eine zweite Injektion 10-fach höherer Tumorzellzahl führt zu letalem Wachstum.

Ein Beispiel des Wachstumsverlaufs von Ehrlich Ascites Tumorzellen in verschiedenen Mäusestämmen ist in Abb. 3 dargestellt. Die Ordinatenwerte (Δg) wurden dadurch ermittelt, indem vom jeweiligen aktuellen Gewicht der Mäusegruppen das zu Versuchsbeginn (= Tag 0) gemessene Gewicht subtrahiert wurde. Das natürliche Wachstum der Tiere kann gegenüber dem Tumorwachstum vernachlässigt werden (84).

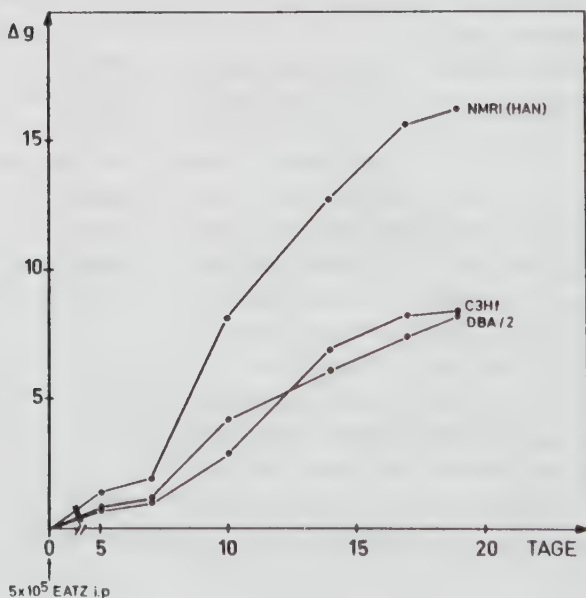


Abb. 3: Intraperitoneales Wachstum des Ehrlich Ascites Tumors in drei verschiedenen Mäusestämmen

Dividiert man die in Abb. 3 als Kurve dargestellte Gewichtszunahme durch die Versuchszeit, so erhält man die Wachstumsgeschwindigkeit v (85).

Tabelle 2: Intraperitoneale Wachstumsgeschwindigkeit des Ehrlich Ascites Tumors in verschiedenen Mäusestämmen

TAG 0: 5×10^5 EATZ i.p.						
TAG	NMRI (Han)		C3Hf		DBA/2	
	Δg^*	v^{**}	Δg	v	Δg	v
+ 7	1.9	0.27	1.0	0.14	1.2	0.17
+ 10	8.1	0.81	2.9	0.29	4.2	0.42
+ 14	12.7	0.91	6.9	0.49	6.1	0.44
+ 17	15.6	0.92	8.2	0.48	7.4	0.44
+ 19	16.2	0.85	8.4	0.44	8.2	0.43

* Δg : Gewichtszunahme der Tiere gegenüber Tag 0 in Gramm

** v : Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors
(Tumorgewicht/Versuchszeit)

Die inokulierte Tumormenge von 5×10^5 Zellen ist für alle Versuchstiere letal. Es können jedoch quantitative Unterschiede im intraperitonealen Wachstumsverlauf des Tumors innerhalb dieser drei Mäusestämme festgestellt werden. In NMRI-Mäusen wächst der Tumor nahezu doppelt so schnell wie in DBA/2- oder C3Hf-Mäusen. Dies mag daran liegen, daß die Ausbildung eines vielfach verzweigten Kapillarnetzes im Peritoneum unterschiedlich ist. Dieses Kapillarnetz ermöglicht die Exsudation, die für die Ernährung der Tumorzellen im Peritonealraum notwendig ist. Bedingt wird die Kapillarisation des Peritoneums wahrscheinlich durch einen vom Tumor selbst gebildeten Faktor (Folkman-Faktor, (86)). Somit lässt sich das sprunghafte Ansteigen des Tumorgewichts zwischen dem 7. und 10. Tag durch die beginnende Exsudation in den Peritonealraum erklären, die durch das vermehrte Nährstoffangebot auch die logarithmische Proliferation der Tumorzellen aufrecht erhält (s. Abb. 34, S. 133). Es ist bekannt, daß die für das intraperitoneale Tumorstadium notwendige Exsudation proportional zur gebildeten Tumorzellzahl verläuft (71). Zwischen dem 17. und 19. Tag zeichnet sich in allen drei Tierstämmen der Übergang des Tumorstadiums in die terminale Plateauphase ab, wodurch das maximale Ausmaß des Tumors erreicht ist. Bis zum 30. Tag nach Setzen des Tumors sterben alle Tiere.

1.2. Schlußfolgerungen aus den Vorversuchen

Sowohl das Angehen kleinster Tumormengen (Tab. 1) als auch das progressive Wachstum des EAT in NMRI-Mäusen (Abb. 3, Tab. 2) legt den Schluß nahe, daß der Histokompatibilitätsunterschied zwischen Tumor und Wirt äußerst gering sein muß. Obwohl es sich bei den NMRI(Han)-Mäusen

um Auszuchttiere handelt, und infolgedessen eine gegenseitige Inkompatibilität vorliegt, bleibt das EAT-Wachstum in diesen Tieren davon unbeeinflusst, so daß das NMRI-EAT-System als nahezu syngen betrachtet werden kann. Dies ist als Folge eines Anpassungsprozesses des Tumors an seinen Wirt innerhalb der vielen Transplantationsgenerationen anzusehen, die in ihm geführt wurden. Derartige Veränderungen eines Tumors durch serielle Transplantationen, wie z.B. LD₅₀-Abnahme etc. sind bereits von mehreren Autoren beschrieben worden (87-89). Das Wachstum eines Tumorkulums von 1 - 10 Zellen in NMRI-Tieren zeigt, daß tumorspezifische Transplantationsantigene, wenn überhaupt vorhanden, sehr schwach oder ganz verborgen sein müssen. Phänomenologisch verhalten sich Tumor und Wirt vollständig syngen.

Durch die Verwendung des NMRI-Stammes und dieser EAT-Sublinie haben wir somit ein Modell in der Hand, bei dem die Transplantationsimmunologie offensichtlich keine nachweisbare Rolle spielt.

Neben den auf S. 34 aufgeführten Gründen ist das deutlich geringere Wachstum des EAT in den anderen Mäusestämmen wahrscheinlich auch dadurch bedingt, daß sich diese Mäuse genetisch vom Ehrlich Ascites Tumor unterscheiden. Gegenüber diesen Tieren trägt der Tumor offensichtlich noch erkennbare Transplantationsantigene, die zu einer zellulären Abstoßungsreaktion führen. Daraus erklären sich die niederen Tumorgewichte und die langsame Wachstumsgeschwindigkeit. Trotz des immunologisch bedingten Zellverlustes gewinnt schließlich das maligne Wachstum bei hohen Tumorzellzahlen die Oberhand, so daß alle Tiere an ihrem Tumor sterben.

Ein Zeichen dafür, daß in diesen Tieren tatsächlich eine zelluläre Immunreaktion gegen den Tumor abläuft, ist die Beobachtung, daß das Peritonealexsudat dieser genetisch

differenten Mäusestämme schon nach wenigen Tagen nach Inokulation der Tumorzellen stark haemorrhagisch ist (83).

1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse der Vorversuche

1. Das Ehrlich Ascites Karzinom besitzt offenbar Transplantationsantigene für verschiedene Mäusestämme (Tabelle 1). In ihnen kann intraperitoneales Tumorstadium in 50% der Fälle erst ab einer Tumorzellzahl von 1×10^5 erreicht werden ($LD_{50} = 1 \times 10^5$). Geringere Tumordinokula werden nicht akzeptiert.

2. NMRI-Auszuchtmäuse akzeptieren EAT-Transplantate in 50% der Fälle bereits schon ab einer Zellzahl zwischen 10 und 100 Zellen ($LD_{50} < 10^2$). Selbst eine EAT-Zelle kann in 20% der Fälle sich im Peritonealraum vermehren und das Tier töten.

Es wird daraus gefolgert, daß entweder zwischen NMRI (Han)-Mäusen und dieser EAT-Sublinie eine syngene Tumor-Wirt-Beziehung besteht oder tumorspezifische Transplantationsantigene des EAT schwach bzw. verborgen sein müssen.

2. Steigerung der Tumorabwehr durch prophylaktische Gabe von LL und LLA

2.1. Ehrlich Ascites Tumor

Es ist bekannt, daß Mäuse nach i.p. Applikation verschiedener Adjuvantien in der Lage sind, das i.p. Anwachsen des EAT zu verhindern (90-93). Dies gilt auch für das natürliche LL und seine synthetischen Analoga (55,56,94,102).

Werden NMRI-Mäuse i.p. mit 2000 µg natürlichem Lysolecithin oder bestimmten LLA 4 Tage vor einer ebenfalls i.p. erfolgreichen Inokulation von 1×10^4 EATZ behandelt, so kann dieses normalerweise absolut tödliche Tumordinokulum in 100% der Fälle abgestoßen werden. Darüber hinaus sind die Tiere gegen ein zweites, 100-fach höheres Tumordinokulum immun.

Da am Tag der Tumordinokulation (= Tag 0) im Bauchraum der Tiere kein LL bzw. LLA mehr nachweisbar ist, kann eine direkte cytotoxische Einwirkung des Lysolecithins und seiner synthetischen Analoga auf die Tumorzellen ausgeschlossen werden. Durch die intraperitoneale LL-bzw. LLA-Applikation wird ein lokaler, steriler Entzündungsreiz gesetzt, der durch ein massives Einwandern immunkompetenter Zellen (inflammatorische, d.h. granulocytäre Antwort in den ersten beiden Tagen, dann vor allem Makrophagen und deren Vorläufer aus dem Knochenmark bis zum 4. Tag) in den Bauchraum der Tiere gekennzeichnet ist. Am 4. Tag nach Setzen der Entzündung wird das intraperitoneale Zellbild in der Majorität von 60-70% Makrophagen beherrscht, 15-35% entfallen auf Lymphocyten und 5% auf Granulocyten. Der niedere prozentuale Anteil der Granulocyten zeigt, daß zu diesem Zeitpunkt die Entzündung im Bauchraum abgeklungen ist. Insgesamt stellt dieses Infiltrat eine Population von ca. 30×10^6 PEZ dar, was dem 10-fachen Normalwert in NMRI-Kontrolltieren entspricht (55).

Zur näheren Charakterisierung dieser durch Lysolecithin oder Lysolecithin-Analoga erreichten Tumorphylaxe galt es folgende Fragen zu klären:

Inwieweit ist ein Lysolecithin-induzierter Tumorschutz noch gewährleistet wenn

1. die Tumorzellzahl entweder bis 10^7 Zellen erhöht oder auf eine Tumorzelle gesenkt wird ("sneaking through" ?), sowie

2. die am Tag -4 injizierte Menge Lysolecithin von 10 µg bis 1000 µg variiert wird, und schließlich
3. wenn sich der zeitliche Abstand zwischen Lysolecithinverabreichung und Tumordinokulation ändert ?

Tumorzellzahl

Tabelle 3 zeigt den Einfluß von 1000 µg Lysolecithin i.p. auf das Wachstum verschiedener Ehrlich Ascites Tumorzellzahlen. Selbst bei einer Erhöhung der Tumoralast um das 100-fache der üblichen Dosierung von 1×10^4 Tumorzellen geht der Tumor in 70% der Fälle nicht an. Wird die Tumoralast auf 5×10^6 und mehr gesteigert, dann gelingt es trotz intraperitonealer Vorbehandlung der Tiere mit 1000 µg Lysolecithin nicht mehr, das Tumorzellwachstum zu verhindern. Jedoch ist die durch das Tumorzellwachstum bedingte Gewichtszunahme in diesen Tieren deutlich verlangsamt. Diese Retardierung ist über den gesamten Versuchszeitraum hinweg zu beobachten. Bis zu Versuchsende liegt aufgrund dieser Retardierung ein um die Hälfte geringeres Tumorgewicht als in der Kontrolle vor.

Tabelle 3: I.p. Wachstum steigender Zellzahlen des Ehrlich Ascites Tumors nach i.p. Applikation von Lysolecithin

TAG -4 :			TAG 0: EATZ I.P.			
I.P.	5×10^4	1×10^5	5×10^5	1×10^6	5×10^6	10×10^6
1000 µg LL	9/10*	9/10	9/10	7/10	1/10**	0/10**
PBS (KONTROLLE)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

* ÜBERLEBENDE/GRUPPE (NMRI ♀)

** RETARDIERUNG DES TUMORWACHSTUMS

LL-Dosierung

Die protektive Wirkung verschiedener LL-Dosierungen gegenüber verschiedenen Tumorzellzahlen ($\leq 1 \times 10^5$) ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Das i.p. Wachstum verschiedener Inokula des Ehrlich Ascites Tumors nach i.p. Injektion verschiedener Mengen Lysolecithin
Die Versuchstiergruppen (LL) bestanden aus jeweils 10 Mäusen, die Kontrollgruppen (PBS) aus jeweils 25 Mäusen.

INJEKTION	E A T Z	TAG -4 : LL I.P. (μ g)							
		I.P.	1000	500	250	100	50	10	PBS
1. *	1×10^4		90 ***	90	40	20	10	0	0
2. **	1×10^5		90	90	40	10	10		
			(I.)			(II.)			
1.	1×10^3		100	100	20	10	10	0	4
2.	1×10^4		90	80	20	10	10		4
1.	1×10^2		100	70	20	0	10	10	8
2.	1×10^3		100	50	10		10	10	4
1.	1×10^1		100	100	80	90	70	90	63
2.	1×10^2		90	40	0	0	0	20	4
			(III.)			(IV.)			
1.	1×10^0		100	100	80	100	90	70	80
2.	1×10^2		100	40	20	0	20	10	20

* = 1. INJEKTION AM TAG 0

** = 2. INJEKTION 60 TAGE NACH DER 1. INJEKTION

*** = ÜBERLEBENDE IN % (NMRI ♀)

BLÖCKE I, II, III, UND IV : SIEHE TEXT

Während mit 500 bzw. 1000 μg LL das Wachstum des Tumors in jeder Gruppe verhindert werden kann (in Tab. 4 Blöcke I und III), ist ein derartiger optimaler Effekt mit 250 μg LL und weniger bei keiner Tumorzellzahl feststellbar (in Tab. 4 Blöcke II und IV).

Selbst bei so niedrigen Tumorzellzahlen von 1 bis 10 Zellen konnte kein signifikanter Unterschied zum Tumorwachstum in den Kontrolltieren erzielt werden (Block IV in Tab.4).

Nach 2 Monaten lag in diesen Gruppen keine Immunität gegen ein erneutes Tumorinokulum 10- bzw. 100-fach höherer Dosierung vor. Sie war jedoch in den mit 500 μg LL und vor allem in den mit 1000 μg LL gespritzten Gruppen vorhanden (in Tab.4 Block III). Da eine Immunisierung der Tiere mit einer bzw. zehn Ehrlich Ascites Tumorzellen ausgeschlossen wird, kann diese mit 500 μg und 1000 μg LL erreichte Tumorresistenz als reiner Lysolecithin-Effekt angesehen werden. Offenbar induzieren diese Mengen LL im Gegensatz zu 250 μg LL und weniger genügend immunkompetente Peritonealexsudatzellen, die den Tumor abstoßen.

Variation des Intervalls zwischen LL-Vorbehandlung und Tumorinokulation

Die bisherigen Befunde basieren auf LL-Injektionen, die 4 Tage vor Setzen des Tumors erfolgten. Da aber die in Tab. 4 (Block III) dargestellten Ergebnisse darauf hinweisen, daß ein erheblich längerer Schutz vor dem Tumor besteht, wenn höhere Dosen von LL injiziert werden, wurde untersucht, wie lange die protektive Wirkung einer einmaligen i.p. LL-Injektion von mehr als 1000 μg anhält.

Zur Durchführung des Versuches wurden jeweils 10 NMRI-Mäuse an verschiedenen Tagen vor Inokulation von 1×10^4 EATZ mit natürlichem LL bzw. mit dem LLA ET-18-OCH₃ i.p. gespritzt (Tabellen 5 und 6).

In der Tat können noch 80% der Tiere, denen 30 Tage vor Setzen des Tumors 2000 µg natürliches LL i.p. injiziert worden war, das Wachstum des Tumors verhindern und eine spezifische Immunität gegen ein zweites, 10-fach höheres Tumordinokulum aufbauen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Dauer der durch Lysolecithin vermittelten Antitumorwirkung

INJEKTION	E A T Z	2000 µg LL i.p. AN DEN TAGEN					
I.P.		-30	-25	-20	-15	-10	-5
1. *	1×10^4	8/10 ^{***}	7/10	9/10	10/10	8/10	9/10
2. **	1×10^5	8/10	7/10	9/10	10/10	8/10	9/10

* = 1. INJEKTION AM TAG 0

** = 2. INJEKTION 60 TAGE NACH DER 1. INJEKTION

*** = ÜBERLEBENDE / GRUPPE VON 10 NMRI (HAN) ♀

Dieses Ergebnis konnte in allen der untersuchten Tage erzielt werden. Die Tabelle zeigt, daß der Schutz gegenüber dem Anwachsen des Tumors für mindestens 30 Tage anhält. Unter der Annahme, daß 10 - 100 Tumorzellen kein ausreichender antigener Stimulus sind, können die Ergebnisse

aus Tab. 4, Block III (S. 39) so interpretiert werden, daß nach einer einmaligen Injektion von 500 bzw. 1000 µg Lysolecithin ein Schutz gegenüber einem letalen Inokulum von 1×10^2 Tumorzellen bis zu 60 Tagen erzielt werden kann.

Tabelle 6: Dauer der durch ET-18-OH vermittelten Antitumorwirkung

EATZ	I.P.	1000 µg ET-18-OH						I.P. AN DEN TAGEN
AM TAG 0		-12	-8	-6	-4	-2	-1	
1 x 10 ⁴		9/10 [*]	8/10	10/10	9/10	9/10	10/10	
KONTROLLE	0/10							
(PBS)								

* = ÜBERLEBENDE / GRUPPE (NMRI ♀)

Wie in Tabelle 6 dargestellt ist, konnte im wesentlichen dasselbe Ergebnis mit einem synthetischen Analogon erzielt werden. Die Untersuchungen mit diesem Analogon sind allerdings aus Substanzmangel nicht in demselben Umfang durchgeführt worden. In diesem Versuch wurde mit LLA-Injektionen bereits 1 bzw. 2 Tage vor Setzen des Tumors begonnen. Der geringe Abstand zwischen Injektion von LLA und Tumorzellen schließt jedoch in diesen Gruppen eine direkte cytotoxische Wirkung des ET-18-OH nicht aus, da es erheblich langsamer metabolisiert wird als das natürliche Lysolecithin. Ausführliche Untersuchungen über den Effekt von LL bzw. LLA auf Tumorzellen in vivo sind im Verlauf der Arbeit von Tarnowski durchgeführt worden (95).

Tieralter

Bei einer Vielzahl von Versuchen, bei denen LL oder seine Analoga i.v. injiziert wurden zeigte sich, daß der Therapieerfolg stark vom jeweiligen Alter der Versuchstiere abhängig war. Je jünger die Tiere, desto besser der Therapieerfolg und die Reproduzierbarkeit der Versuche.

Dies gab Anlaß zu der Frage, ob auch im bisherigen System der Tumorphylaxe mit LLA ein je nach Alter des Versuchstieres unterschiedlicher Schutz zu beobachten ist. In der Tat zeigte sich bei diesen Untersuchungen, daß auch in diesem System das Tieralter eine wichtige Variable ist, die den Antitumoreffekt beeinflussen kann. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Tabellen 7 und 8 sowie Abbildungen 4,5 und 6 wiedergegeben.

Tabelle 7: Einfluß des Tieralters auf die durch ET-18-OCH₃ vermittelte Tumorphylaxe

TAG -4: ET-18-OCH ₃ i.p.			
TAG 0 : 1 x 10 ⁴ EATZ i.p.			
NMRI-MÄUSE (q) VERSCHIEDENEN ALTERS			
DOSIS			
ET-18-OCH ₃ (µg)	5 WOCHEN	50 WOCHEN	100 WOCHEN
500	100 [*]	100	10
250	90	40	0
100	40	0	0
KONTROLLE (PBS)	0	0	0

* = ANGABEN DER ÜBERLEBENDEN IN %

Fünf, fünfzig und hundert Wochen alte weibliche NMRI-Mäuse wurden 4 Tage vor Inokulation von 1×10^4 EATZ mit verschiedenen ET-18-OCH₃-Konzentrationen i.p. gespritzt.

Die Gruppen der 5 Wochen alten Mäuse besitzen bei jeder ET-18-OCH₃ Dosierung die meisten Überlebenden. Mit dem synthetischen LLA ET-18-OCH₃ kann selbst noch mit 250 µg ein Überleben der Tiere in 90%, mit 100 µg in 40% der Fälle erzielt werden. Das ist doppelt so viel wie es mit dem natürlichen LL bei gleicher Tumorzellzahl und gleichem Tieralter erreicht wird (Tab. 4, Block II, S. 39).

Werden 50 Wochen alte NMRI-Mäuse mit 500 µg ET-18-OCH₃ i.p. gespritzt, dann geht auch hier der Tumor in keinem der Tiere an. Bei 250 µg findet sich bereits ein deutlicher Unterschied gegenüber 5 Wochen alten Tieren. Hier überlebt weniger als die Hälfte der Tiere und bei 100 µg kann im Gegensatz zu 40% Überlebenden bei 5 Wochen alten Mäusen kein Tier gerettet werden.

Dieser Befund wird noch deutlicher bei den 100 Wochen alten Tieren, von denen nur eine Maus nach Injektion von 500 µg LLA den Tumor überlebt. Hinzugefügt werden muß, daß bei hohen ET-18-OCH₃-Konzentrationen (250 µg und 500 µg) bereits ein Drittel der alten Tiere nach Injektion des Analogons innerhalb von 12 - 24 Stunden gestorben ist.

Bei der Differenzierung der durch ET-18-OCH₃ induzierten Zellpopulation finden sich rein zahlenmäßig zwischen 5 und 50 Wochen alten Tieren keine hoch signifikanten Unterschiede (Tab. 8, S. 48).

Nur bei 50 und 100 Wochen alten Tieren können nach Injektion von ET-18-OCH₃ atypische, 10-15 μ große mononukleäre Zellen mit stark basophilem Cytoplasmasaum und nicht nierenförmigem Kern ausgemacht werden, die entweder große Lymphoblasten oder Plasmazellen darstellen. Diese Zellen wurden nie in Peritonealexsudatausstrichen von jungen, d.h. 5 Wochen alten NMRI-Mäusen beobachtet. In den Abbildungen 4,5 und 6 sind die Ausstriche dargestellt.



Abb. 4: Peritonealexsudatzellen von 5 Wochen alten NMRI-Mäusen.

Die Mäuse wurden 4 Tage vor Anfertigung des Ausstrichs mit 500 μ g ET-18-OCH₃ i.p. gespritzt.

Deutlich sind Makrophagen an ihrem nierenförmigen Kern zu erkennen, die restlichen Zellen sind Lymphocyten (Vergrößerung 1000 x).

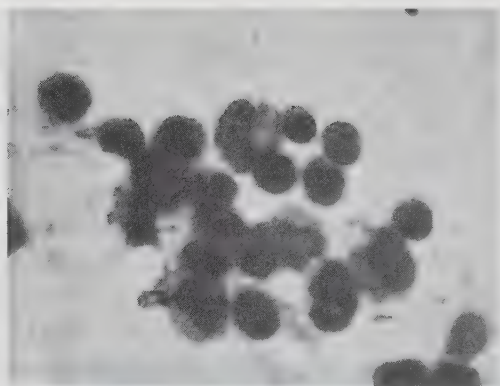


Abb. 5: Peritonealexsudatzellen von 50 Wochen alten NMRI-Mäusen.

Die Mäuse wurden 4 Tage vor Anfertigung des Ausstrichs mit 500 μg ET-18- OCH_3 i.p. gespritzt. Die Zellpopulation besteht aus Makrophagen, Lymphocyten und "Plasmazellähnlichen" (große Lymphoblasten ?) (Vergrößerung 1000-fach).

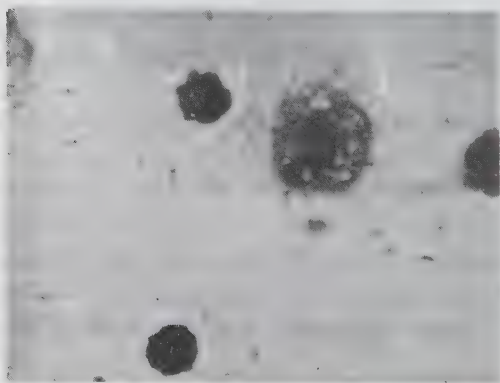


Abb. 6: Peritonealexsudatzellen von 100 Wochen alten NMRI-Mäusen.

Die Mäuse wurden 4 Tage vor Anfertigung des Ausstrichs mit 500 μg ET-18- OCH_3 i.p. gespritzt. Neben anderen Zellen (Lymphocyten ?) ist ein großer Makrophage zu erkennen, der eine starke Vakuolisierung aufweist (Vergrößerung 1000-fach).

Auffällig ist dabei, daß die Peritonealzellen der 50 und 100 Wochen alten Tiere z.T. erheblich vakuolisiert sind und daß auch das Exsudat erheblich zellreicher ist. Diese auffallend starke Vakuolisierung der Makrophagen war auch in den mit PBS vorbehandelten Kontrolltieren gleichen Alters zu beobachten.

Sowohl die in Tabelle 8 dargestellte Differenzierung der Peritonealzellen wie auch die Abbildungen 4,5 und 6 lassen keine Interpretation zu, die mit den in Tabelle 7 dargestellten Unterschieden im Schutz gegen den Tumor bei jungen und alten Tieren korreliert werden könnte .

Es könnte sein, daß 50 Wochen alte NMRI-Mäuse noch in der Lage sind, auf eine ET-18-OCH₃-Injektion von 500 µg mit der Rekrutierung und Neueinwanderung immunkompetenter Zellen zu antworten. Mit 250 µg ET-18-OCH₃ werden noch 40% Überlebende erreicht. Offenbar ist diese Konzentration für dieses Tieralter nicht ausreichend, um eine verstärkte Einwanderung immunkompetenter Zellen (Makrophagen) zu provozieren, wie es bei 5 Wochen alten NMRI-Mäusen der Fall ist. Der Makrophagenanteil im Peritonealexsudat von 32% ist, wie Peritonealexsudatausstriche zeigen, nur gering von dem der Kontrolle verschieden (Tabelle 8). Die ortständigen Makrophagen sind möglicherweise durch die ET-18-OCH₃ - Injektion aktiviert worden, doch reichen sie offensichtlich zahlenmäßig nicht aus, um den Tumor an seinem Weiterwachsen zu hindern.

Tabelle 8: Differenzierung der durch ET-18-OCH₃ induzierten Peritonealexsudatzellen aus verschiedenen alten NMRI-Mäusen.

TAG -4 : ET-18-OCH ₃ i.p. (NMRI ♀)												
ZELLTYPEN *	KONTROLLE (PBS)		500 µg		250 µg		100 µg		TIERALTER (WOCHEN)	TIERALTER (WOCHEN)	TIERALTER (WOCHEN)	100 µg
	TIERALTER (WOCHEN)		TIERALTER (WOCHEN)		TIERALTER (WOCHEN)		TIERALTER (WOCHEN)					
	5	50	5	100	5	50	5	100				
MAKROPHAGEN	35	36	59	60	74	83	65	32	1	66	24	29
LYMPHOZYTEN	56	54	41	34	23	17	35	24	23	32	40	68
GRANULOZYTEN	9	10	0	6	3	0	0	5	1	2	2	1
PLASMAZELL- ÄHNLICHE	-	-	-	-	-	-	-	39	75	-	34	2

• = PEZ-AUSSTRICH AM TAG 0

** = ANGABEN IN §

*** = STARK VAKUOLISIERT

Bei 100 Wochen alten NMRI-Mäusen kann mit keiner der gespritzten ET-18-OCH₃-Dosierungen ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle im Schutz gegen 1×10^4 EATZ erzielt werden. Obwohl der Makrophagenanteil bei 500 µg ET-18-OCH₃ über 80% beträgt, ist die bei diesem Prozentsatz zu erwartende Tumorprotektion nicht eingetreten. Auffallend ist, daß über die Hälfte aller Makrophagen in diesen alten Tieren stark vakuolisiert ist (Abb. 6). Dies könnte darauf hindeuten, daß die Makrophagen in ihrer Funktion beeinträchtigt sind.

2.2. MPC-11-Myelom

Tabelle 6 (S. 42) demonstriert, daß NMRI-Mäuse durch eine i.p. Injektion von 1000 µg ET-18-OH gegen das Angehen eines 4 Tage später ebenfalls i.p. injizierten EAT vollkommen geschützt sind.

In Analogie zu diesen Prophylaxeexperimenten sollte im Folgenden mit Balb/c-Mäusen gezeigt werden, ob gegen das s.c. Wachstum des MPC-11-Myeloms ebenfalls ein derartiger Schutz vorliegt, wenn den Tieren 1000 µg ET-18-OH s.c. an den Ort der 4 Tage später erfolgenden Tumordinokulation gespritzt werden (Wachstumsstudien zeigten, daß dieser Tumor sich s.c. besser, d.h. regelmäßiger mit niedrigerer Tumorzellzahl transplantieren lässt, als i.p.; gleiches gilt auch für das X5563-Myelom). Überraschenderweise tritt jedoch statt des erwarteten protektiven oder zumindest retardierenden Effektes das Gegenteil ein: Der inokulierte Tumor (5×10^4 TZ s.c.) wächst in den mit ET-18-OH vorbehandelten Mäusen schneller an als in der PBS-Kontrolle. Eine Woche nach Tumordinokulation ist bei ihr nur ein Tier der 7-er Gruppe als (+)-tumorphisitiv palpierbar (+ = Tumor Ø bis zu 5 mm), während alle 7 Mäuse der Versuchsgruppe bereits

deutlich sichtbar den Tumor tragen; bei 4 Mäusen dieser Gruppe kann der Tumor als (++) (= Tumor $\emptyset$ bis 10 mm), bei 3 Mäusen als (+++) (= Tumor $\emptyset$ bis 20 mm) palpiert werden. Am 10. Tag nach Tumorinokulation sind bis auf eine Ausnahme (bei der noch kein Tumor palpabel ist) alle Kontrolltiere (+)-tumorpositiv, alle Versuchstiere dagegen bereits (+++)-tumorpositiv. Am 14. Tag haben alle Kontrolltumoren erst die Größe erreicht, die in der Versuchsgruppe bereits schon am 7. Tag als (++)-Stadium palpiert wurde. Alle Tiere der Versuchsgruppe sind immer noch (+++)-tumorpositiv. Bis zum 20. Tag sind sie mit einer Tumorgröße von (++++)(= Tumor $\emptyset$ > 20 mm, z.T. zentral nekrotisch und kontralateral ausgedehnt) bereits gestorben, wohingegen die Kontrolltumoren inzwischen das (++) bzw. (++)-Stadium erreicht haben.

Diese Befunde demonstrieren eine schnellere Tumorentwicklung in den mit ET-18-OH vorbehandelten Mäusen. Dieser Umstand kann möglicherweise darin seine Erklärung finden, daß zum Zeitpunkt der Tumorinokulation die lokale Entzündung, die durch die ET-18-OH-Injektion gesetzt wurde, noch nicht vollends abgeklungen ist (Arnold u. Mitarb. fanden für s.c. gespritztes LLA eine relative hohe Verweildauer am Ort der Injektion (96)), und aufgrund der dadurch noch vorherrschenden guten Durchblutung der Entzündungsort (= Injektionsort) eine bessere Ernährung für den Tumor gewährleistet, als dies in der Achselregion der Kontrolltiere der Fall ist. Sicherlich ist ein Grund für die relativ lange Verweildauer von s.c. injiziertem ET-18-OH (und damit der Entzündung) in der s.c. Darreichungsform per se zu suchen, denn der s.c. Raum, beispielsweise in der Achselhöhle, ist im Vergleich zum Peritonealraum um ein Mehrfaches geringer; das injizierte ET-18-OH liegt hier für längere Zeit konzentrierter vor als nach einer i.p.

Injektion in der Bauchhöhle, wo aufgrund der peritonealen Flüssigkeit eine rasche Verteilung auf die gesamte Oberfläche des Peritonealraums eintritt, wodurch die Aufnahme über das Kapillarnetz in den Organismus an vielen Stellen erfolgen kann und infolgedessen die lokale Entzündung schneller abklingt (nach 4 Tagen ist in der Peritonealhöhle kein radioaktiv markiertes Lysolecithin mehr nachweisbar; Munder, pers. Mitteilung).

2.3. X5563-Myelom

In Studien zur Prophylaxe gegen das Myelom X5563 durch Vorbehandlung mit ET-18-OH konnte grundsätzlich die gleiche Feststellung gemacht werden wie im MPC-11-Tumorsystem. Werden C3Hf-Mäuse mit 1000 µg ET-18-OH s.c. gespritzt und erfolgt darauf 4 Tage später eine s.c. Tumorumplantation an die Stelle der Vorbehandlung, dann wächst der Tumor im Vergleich zur Kontrolle, die mit PBS s.c. vorbehandelt wurde, schneller an. Demzufolge sterben die Versuchstiere früher. Diese Ergebnisse können im gleichen Sinne interpretiert werden, wie dies bereits für die entsprechenden Ergebnisse im MPC-11-Tumorsystem getan wurde (S.50). In diesem X5563-Tumorsystem kommt jedoch noch eine weitere Beobachtung hinzu, die auf eine Teilfrage zurückgeht: Falls es - wie im Abschnitt 2.2. spekuliert wird - zutreffen sollte, daß die Entzündung, die nach der Injektion von 1000 µg ET-18-OH lokal am Injektionsort auftritt, noch bis zum Zeitpunkt der Tumorumplantation an dieser Stelle vorhanden ist, und der Entzündungsort (= Injektionsort) eine ideale Situation für die Nidation

des Tumors darstellt, dann müßte eine subletale Tumordosis in diesem durch Exsudation und starke Kapillarisation präkonditionierten Milieu vermehrt die Chance haben anzuwachsen und sich zu etablieren. Tatsächlich konnte festgestellt werden, daß dieser Tumor mit einer Zellzahl, die unterhalb der Transplantationsschwelle liegt, nur in den mit ET-18-OH vorbehandelten Tieren angeht, während die mit PBS-vorbehandelten Kontrolltiere diese Zelldosis wie erwartet vollkommen abstoßen.

Bereits am 10. Tag nach Implantation ist der Tumor bei 3 von 8 Tieren deutlich im (+)-Stadium (Tumor Ø bis 5 mm) palpabel. Drei Tage später sind es schon 6 von 8 Mäusen, die (+)- bzw. (++)-tumorphositiv sind (Tumor Ø bis 10 mm). Bis zum 28. Tag post implantationem hat sich der Tumor in 7 der 8 Versuchstiere zu einer 20 mm und mehr im Durchmesser großen Geschwulst entwickelt ((+++)- bzw. (++++)-Stadium), so daß 2 Tiere bereits verstorben sind. Bei keinem der Kontrolltiere dagegen konnte bis Versuchsende ein Tumor palpiert werden.

Diese Befunde zeigen, daß ein geringes Tumorkinokulum normalerweise von der unbehandelten C3Hf-Maus bewältigt werden kann, daß sie aber nach s.c. Vorbehandlung mit 1000 µg ET-18-OH nicht mehr imstande ist, dem Wachstum dieser subletalen Tumorzellzahl Einhalt zu gebieten. Der Zustand des Injektionsortes erlaubt es dem Tumor weiterzuwachsen, so daß er schließlich der Abwehr des Organismus entweicht und die betroffenen Tiere tötet. Welche Gründe auch immer tatsächlich für das Angehen und die weitere Tumorentwicklung zutreffend sind (ob z.B. persistierende Entzündung oder nicht), die Vorbehandlung mit 1000 µg ET-18-OH lässt an die Möglichkeit denken, sie als experimentelles Hilfsmittel für den Transfer schwierig zu transplantierender Tumoren einzusetzen,

wie dies von anderen Substanzen wie z.B. von bestimmten Mineralölen bekannt ist (97).

Andererseits deuten diese Befunde auch daraufhin, daß die lokale Injektion von entzündungsfördernden Substanzen in der Tumorthherapie durch die Exsudation und vermehrte Kapillarisation in der Umgebung des Tumors zu einem beschleunigten Wachstum des Tumors selbst führen kann. Beobachtungen dieser Art sind im Experiment und in der Klinik gemacht worden (Munder, pers. Mitt.).

3. Untersuchungen zur Tumorthherapie

3.1. Ehrlich Ascites Tumor

In dem bisher Dargestellten konnte gezeigt werden, daß man prophylaktisch NMRI-Mäuse durch die Gabe von LL und LLA außerordentlich effektiv gegenüber dem Wachstum des Ehrlich Ascites Tumors schützen kann. Es ist aufgrund dieser Vorbehandlungen möglich, den Tieren die 10 000-fache Tumor-Letaldosis (LD_{50}) zu injizieren und es überleben 70% der Tiere. Es ist weiterhin möglich, die Tiere dadurch über einen Zeitraum von 1 - 2 Monaten vor dem Anwachsen des Tumors zu schützen. Die Tatsache, daß der Schutz so lange anhält, deutet daraufhin, daß er nicht in einer Wirkung der Substanz direkt auf die Tumorzellen besteht, sondern daß er in irgendeiner Weise durch Zellen vermittelt wird. Wenn dem so ist, dann müßten diese Zellen auch aktivierbar sein, wenn diese Substanzen - z.B. im Falle des EAT - nicht intraperitoneal, sondern auf einem anderen Wege und an anderer Stelle appliziert werden. Am naheliegendsten war daher zunächst die intravenöse Applikation zu wählen, Während es bei intraperitonealer Appli-

kation der LL oder LLA zu einer lokal begrenzten entzündlichen Reaktion im Bauchraum der Tiere kommt, wobei es vorstellbar ist, daß sowohl die dort anwesenden, wie auch die aufgrund des örtlichen Reizes eingewanderten Abwehrzellen stimuliert werden, wird durch intravenöse Injektionen von LLA das gesamte immunologische System möglicherweise aktiviert.

Die Frage war nur, ob die für die Tumorabwehr verantwortlichen Zellen dann auch rasch und vielleicht in verstärktem Maße an den Ort der Tumorinokulation einwandern, um den Tumor zu zerstören. Da sich in Vorversuchen einerseits die bisherige intraperitoneale Injektion von 1000 µg LLA bei intravenöser Injektion als unwirksam erwies, andererseits bei mehrfacher Gabe die Oberflächenaktivität der verwendeten Substanzen zu lokalen Gefäßschädigungen führte, wurde die Dosis auf 1 - 100 µg verringert, dafür aber täglich über einen Zeitraum von mindestens 14 Tagen injiziert.

In einer umfangreichen Versuchsreihe wurde zunächst geprüft, ob natürliches Lysolecithin, das bei i.p. Injektion von 500 - 2000 µg einen deutlichen Schutzeffekt gegenüber dem EAT bewirkt (s. Tab. 4 und 5, S.39 und 41) bei i.v. Injektion einen ähnlichen Antitumoreffekt besitzt.

In keinem dieser Vorversuche konnte trotz Variation der LL-Dosierung, der Tumorzellzahl und des Therapiebeginns ein Unterschied zu den Kontrollgruppen gefunden werden. Alle mit natürlichem LL behandelten Tiere starben in etwa zu demselben Zeitpunkt wie die Kontrolltiere. Da bekannt war, daß die Fettsäure des natürlichen LL mit einer Lysophospholipase abgespalten werden kann und somit das natürliche LL seine biologische Aktivität verliert, wurden in den folgenden Versuchen nur synthetische Analoga benutzt, die als wichtigstes Unterscheidungsmerkmal zum LL eine Ätherbindung statt der Esterbindung besitzen. Zunächst wurden dabei kurzkettige Lysole-

cithin-Analoga mit einer aliphatischen Seitenkette von 12 C-Atomen und verschiedener Substitution in sn-2 benutzt.

Intravenöse Therapie mit ET-12-X

Wie Abb. 7 und 8 zeigen, wurden tumortragende NMRI-Mäuse ab Tag +1 (Abb. 7) bzw. ab Tag +7 (Abb.8) täglich durch eine i.v. Injektion von 100 µg LLA therapiert.

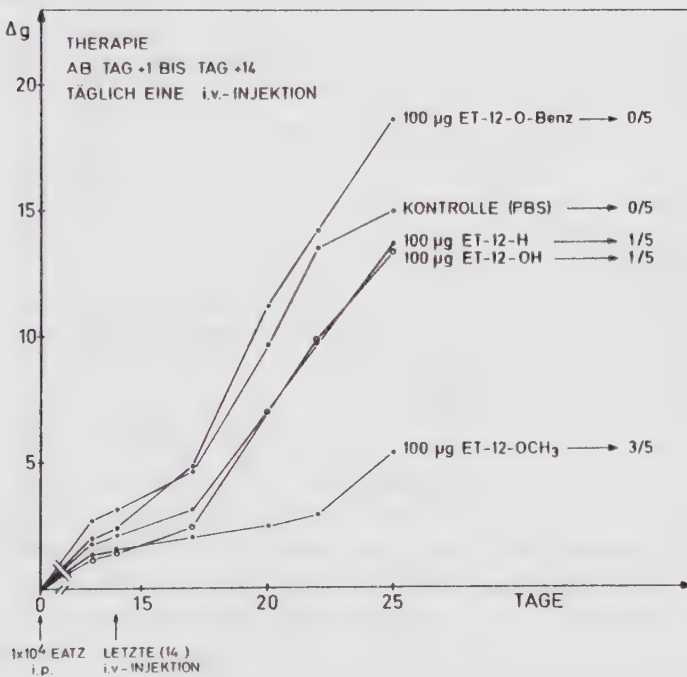


Abb. 7: Einfluß verschiedener kurzkettiger Alkyl-Lysophosphatide (i.v.) auf das Wachstum des EAT.
Therapie: ab Tag +1

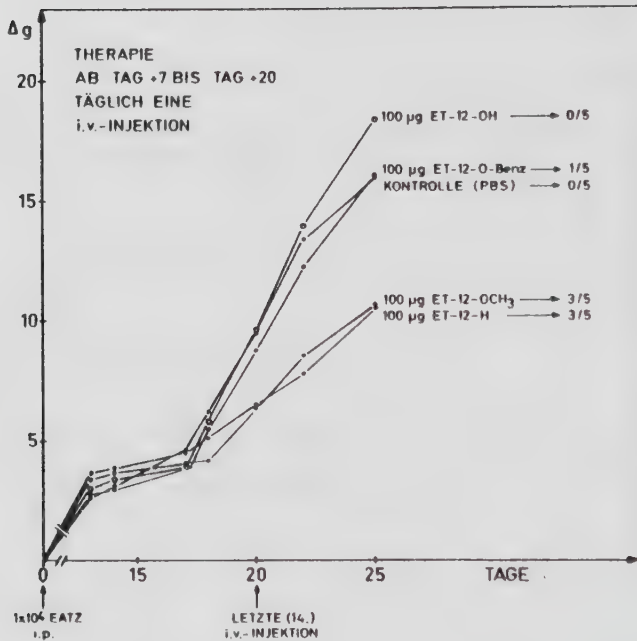


Abb. 8: Einfluß verschiedener kurzkettiger Alkyl-Lysophosphatide (i.v.) auf das Wachstum des EAT.
Therapie: ab Tag +7

Offenbar ist für eine Antitumorwirkung nicht nur die Ätherbindung notwendig (wie dies von Untersuchungen zur Tumorphylaxe bekannt ist (56)), sondern es muß auch die Position 3 des Moleküls substituiert sein, so daß eine Acylierung zu Lecithin unmöglich ist.

Die Befunde mit kurzkettigen Analoga sind insofern bemerkenswert, da in früheren Untersuchungen der Antitumoreffekt kurzkettiger Lysophosphatide bei einmaliger i.p. Injektion deutlich schwächer war als von langkettigen Alkyl-Lysophosphatiden (56). Vielleicht wird durch die tägliche Injektion der Substanz dieser Unterschied zwischen kurz- und langkettig aufgehoben. Die Therapie wurde über 14 Tage durchgeführt.

ET-12-OCH₃ ist in beiden Versuchen die wirksamste Substanz. Obwohl in beiden Versuchen 3/5 Tieren durch ET-12-OCH₃-Injektionen überleben, ist der Verlauf ihrer Tumorstadiumskurven unterschiedlich. Der Grund hierfür ist in den verschiedenen Zeitpunkten des Therapiebeginns zu finden: Während bei einem Therapiebeginn 1 Tag nach Überimpfen von 1×10^4 EATZ die Tumorzellzahl noch relativ gering ist (vielleicht sogar aufgrund einsetzender immunologischer Abwehrmechanismen weniger als 1×10^4 Zellen beträgt), ist sie bei Therapiebeginn am Tag +7 auf ein Vielfaches angestiegen (s. Abb. 34, S. 133). Trotz dieser hohen Tumormasse kann noch bei 60% der Tiere ein therapeutischer Erfolg erzielt werden.

Da nur das ET-12-OCH₃ eine deutliche und auch quantitativ reproduzierbare Antitumorstadiumswirkung besitzt, wurde, wie in Abb. 9 dargestellt, versucht, eine Dosis-Wirkungskurve aufzustellen. Auch in diesem Versuch zeigte sich, daß ET-12-OCH₃ mehr als 50% der Tiere (3/5) schützen kann. Es fand sich keine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung.

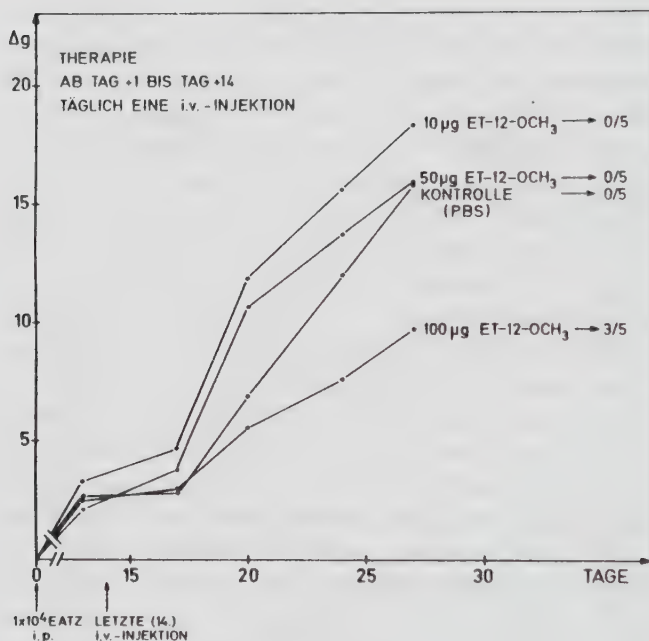


Abb. 9: Einfluß verschiedener ET-12-OCH₃-Dosierungen auf das Wachstum des EAT

Intravenöse Therapie mit ET-18-X

Wie bereits erwähnt, hatten sich in früheren Versuchen sowie bei Experimenten, die in Parallele zu diesen Versuchen in einem anderen Tumormodell durchgeführt wurden, langkettige LLA stets wirksamer erwiesen als kurzkettige (56,94). Daher wurden langkettige LLA ebenfalls ausführlicher unter Variation der verschiedenen Parameter in ihrer Antitumorwirksamkeit gegenüber dem EAT untersucht. Fünf verschiedene LLA mit einer aliphatischen Kohlenstoffkette von 18 C-Atomen und verschie-

dener Substitution in sn-2 wurden nach Setzen des Tumors ebenfalls ab Tag +1 und +7 über 20 Tage intravenös injiziert. Abb. 10 und 11 geben das Ergebnis wieder.

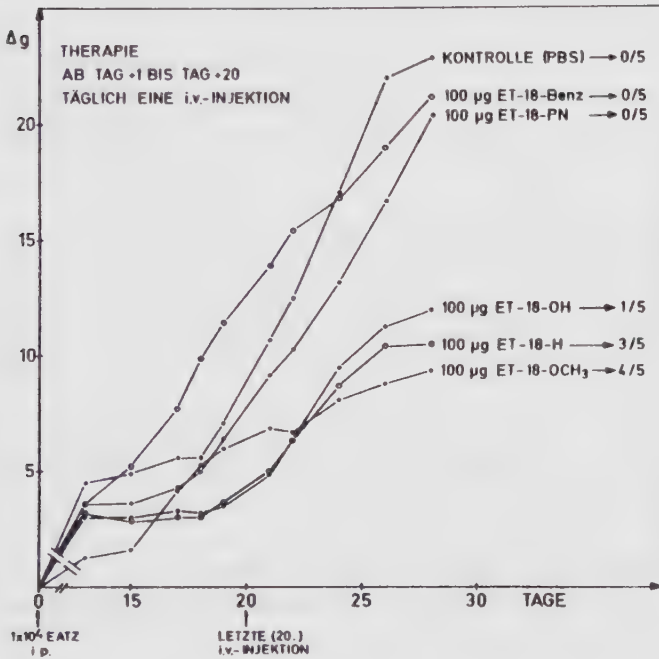


Abb. 10: Einfluß verschiedener langkettiger Alkyl-Lysophosphatide (i.v.) auf das Wachstum des EAT. Therapie: ab Tag +1

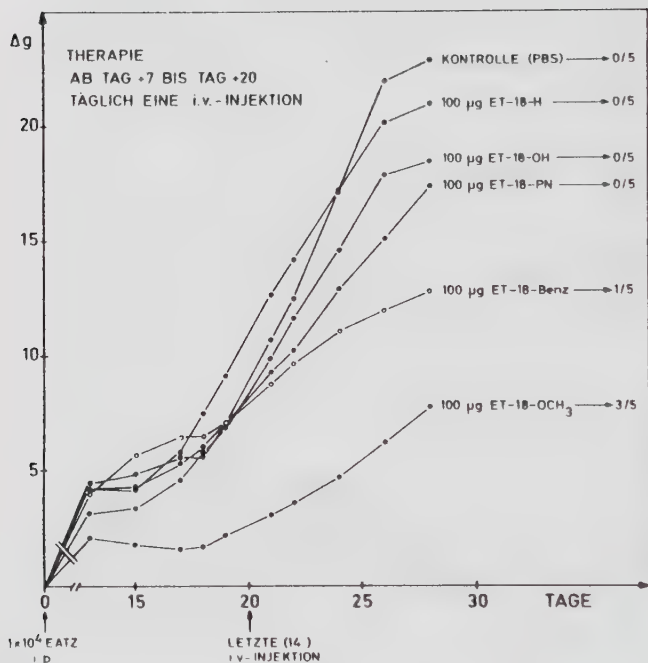


Abb. 11: Einfluß verschiedener langkettiger Alkyl-Lysophosphatide (i.v.) auf das Wachstum des EAT.
Therapie: ab Tag +7

Auch bei diesen Analoga zeigt sich, daß zusätzlich zur Ätherbindung die Substitution in sn-2 entscheidend zur Antitumorwirkung beiträgt. Dabei führt die Substitution mit einer Methoxy-Gruppe erneut zu einer der wirksamsten Antitumor-Substanzen.

ET-18-H hat bei frühem Therapiebeginn (Tag +1) ebenfalls einen guten therapeutischen Effekt. Wie sich in der Verzögerung des Tumorwachstums zeigt, ist ET-18-OH ebenfalls therapeutisch wirksam ; es überlebt jedoch nur 1/5 Tieren (Abb. 10). Da ET-18-OH eine DL-Verbindung ist, können zumindest 50% dieses Analogons zu Lecithin acyliert werden, so daß daraus vielleicht die geringere Antitumorstärke resultiert. Die anderen Analoga haben keinen signifikanten Effekt auf das Tumorwachstum; zum Beispiel wirkt ET-18-O-Benz bei frühem Therapiebeginn auf das Tumorwachstum leicht beschleunigend und bei spätem Therapiebeginn leicht inhibierend (Abb. 10 und 11).

Die in den Abbildungen 7 - 11 dargestellten Ergebnisse führen zu der Schlußfolgerung, daß ET-18-OCH₃ die größte antitumorale Wirksamkeit in vivo besitzt. Aus diesem Grunde wurde diese Substanz für alle weiteren Therapieversuche verwendet.

Die Tatsache, daß das wirksame LLA ET-18-OCH₃ selbst 7 Tage nach Inokulation der EAT-Zellen noch die logarithmische Proliferationsphase unterbrechen kann, führte zu näheren Untersuchungen, durch die gezeigt werden sollte, bis zu welchem Zeitpunkt des Therapiebeginns der Antitumoreffekt von ET-18-OCH₃ noch nachgewiesen werden kann.

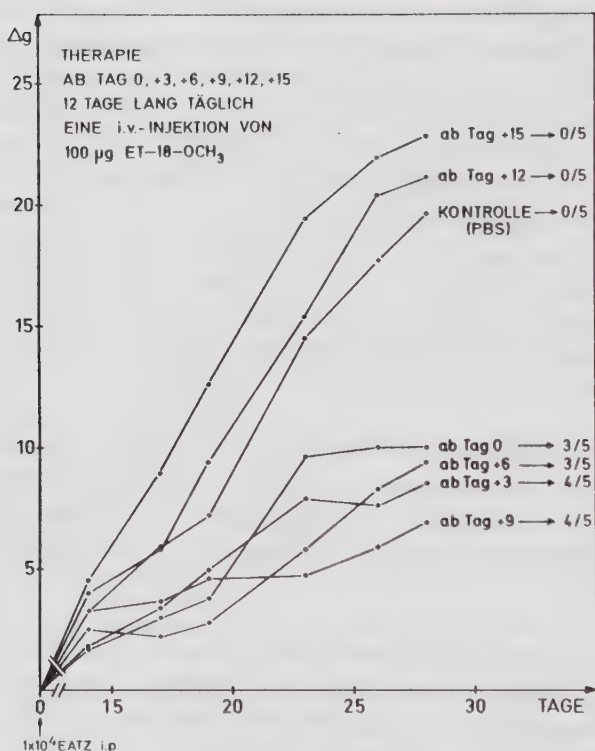


Abb. 12: Variation des Therapiebeginns mit ET-18-OCH₃

Wie Abb. 12 zeigt ist es möglich, mit der Therapie bis Tag +9 zu warten und trotzdem können noch 4/5 Tieren erfolgreich therapiert werden. Ein späterer Therapiebeginn wie ab Tag +12 bzw. +15 hat keinerlei Wirkung. Der Kurvenverlauf deutet sogar daraufhin, daß dann ein leicht beschleunigtes Tumorstadium induziert wird.

Wenn man das in Abb. 12 dargestellte Tumorwachstum der Tiere verfolgt, die nicht geheilt werden konnten, so findet sich trotzdem eine deutliche Retardierung des Tumorwachstums unter der Behandlung mit ET-18-OCH₃, vorausgesetzt, die Therapie beginnt vor dem 10. Tag. Dies ist in Abb. 13 für 3 Tiere dargestellt, die schließlich an ihrem Tumor sterben.

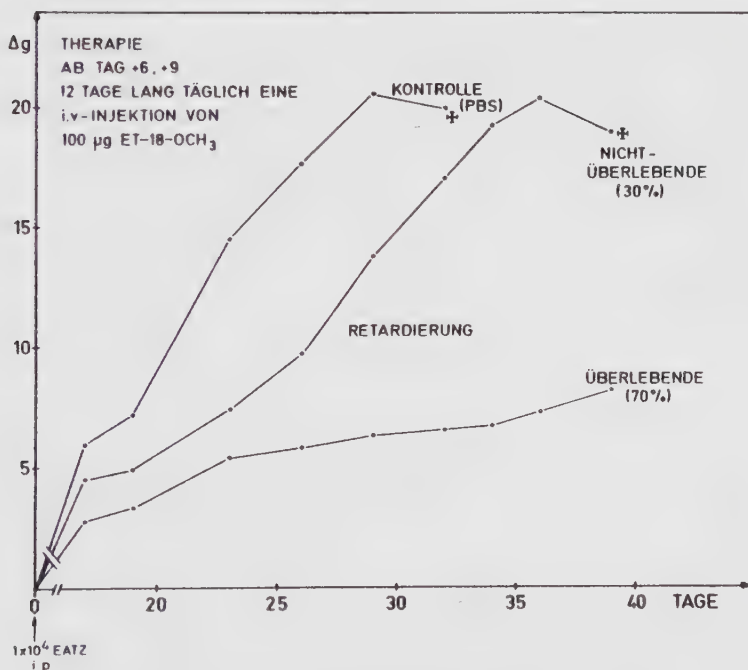


Abb. 13: Retardierung des Tumorwachstums und Verlängerung der Überlebenszeit durch ET-18-OCH₃-Therapie

Außerdem erreicht der Tumor in diesen Tieren weitaus später als die Kontrolle sein Endgewicht, so daß diese Tiere die Kontrolle um fast eine Woche überleben.

Diese Befunde lassen natürlich im Gegensatz zu den i.p. Versuchen den möglichen Schluß zu, daß eine direkte cytotoxische Wirkung auf den Tumor möglich ist, da bei täglicher Applikation und bei einer beginnenden Exsudation in den Bauchraum, wenn der Tumor wächst, diese Substanzen auch fortlaufend, wenn auch möglicherweise an Lipoprotein gebunden, in den Bauchraum eingeschleust werden. Falls eine direkte cytotoxische Wirkung jedoch vorhanden wäre, dann müßte sich in der Tat aber auch eine lineare Dosis-Wirkungskurve zumindest andeutungsweise nachweisen lassen. Dies ist jedoch, wie Abb. 14 demonstriert, nicht der Fall.

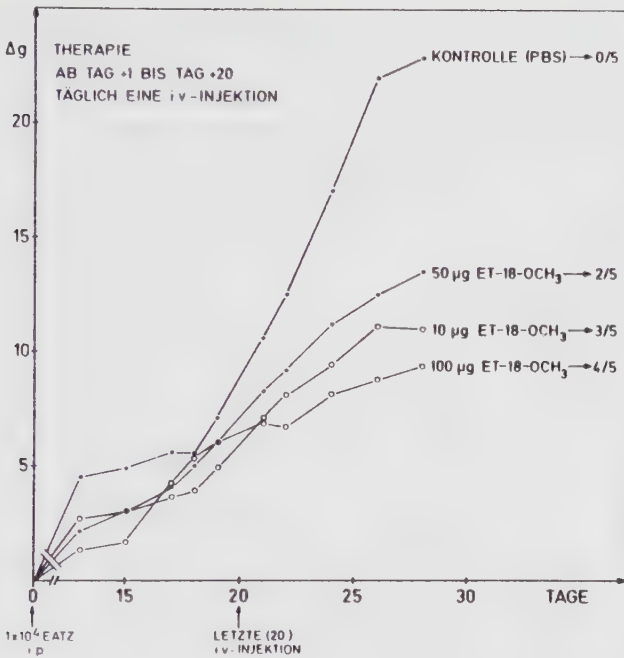


Abb. 14: Einfluß verschiedener ET-18-OCH₃-Dosierungen
auf das Wachstum des EAT.

Therapie: ab Tag +1

Darüber hinaus müßten bei einer direkten cytotoxischen Wirkung auf den Tumor bei täglicher Applikation eigentlich alle Substanzen in etwa dieselbe Wirkung haben, da bei langkettigen Lysophosphatiden die Oberflächenaktivität trotz unterschiedlicher Substitution in sn-2 nahezu gleich ist. Die Affinität zur Zellmembran ist ebenfalls dieselbe (100,101).

Wie Abb. 14 demonstriert, lässt sich jedoch eine Dosis-Wirkungskurve nicht nachweisen. Dies zeigt sich auch in einem weiteren Versuch, bei dem mit der Therapie erst 7 Tage nach Tumorinokulation begonnen wurde (Abb. 15).

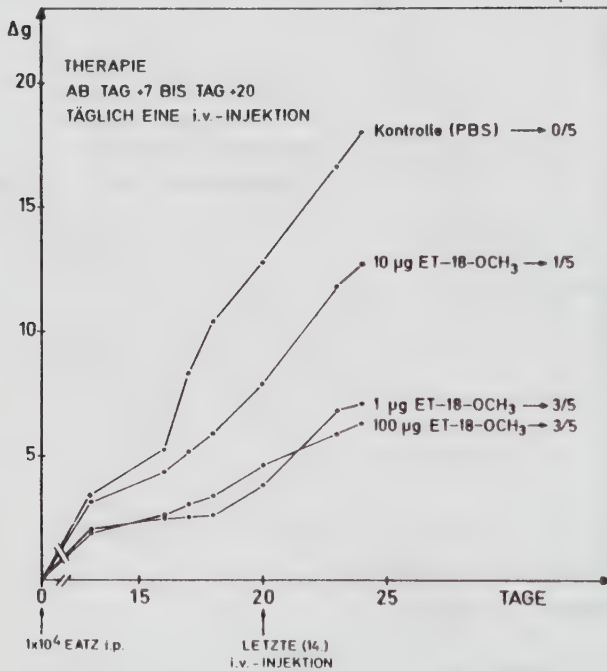


Abb. 15: Einfluß verschiedener ET-18-OCH₃-Dosierungen auf das Wachstum des EAT.

Therapie: ab Tag +7

Überraschenderweise konnte selbst mit $1 \mu\text{g ET-18-OCH}_3$ nicht nur eine enorme Retardierung des Tumorwachstums, sondern selbst die gleiche Anzahl an überlebenden Tieren erreicht werden, wie mit der 100-fach höheren Dosierung. Mit der 10-fach höheren Dosierung ist das Tumorwachstum gegenüber der Kontrolle deutlich retardiert. Bis zu Versuchsende war jedoch nur 1 Tier der 5-er Gruppe ohne Tumor (Abb. 15).

Zusammenfassend ergibt sich aus den bisherigen Ergebnissen, daß bei einem Tumorkinokulum von 1×10^4 EATZ

1. ET-18-OCH₃ die wirksamste Substanz ist, und
2. die Therapie ab Tag +7 genauso effektiv ist wie ab Tag +1, obwohl zu diesem Zeitpunkt die Tumorzellzahl im Peritonealraum bereits auf $10^6 - 10^7$ angestiegen ist (Abb. 34, S.133).

Dies konnte ebenfalls in einem anderen Tumorsystem (MethA-Sarkom) mit dem LLA ET-18-OH festgestellt werden (94,102).

Tumorzellzahl

Nachdem der Zeitraum für den Beginn einer erfolgreichen parenteralen Therapie des EAT mit ET-18-OCH₃ festgelegt worden war, galt es die Frage zu klären, bis zu welcher Tumorzellzahl der Organismus in der Lage ist, unter der Therapie mit ET-18-OCH₃ sich gegen das Anwachsen des Tumors zu wehren. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Abbildungen 16 - 18 dargestellt.

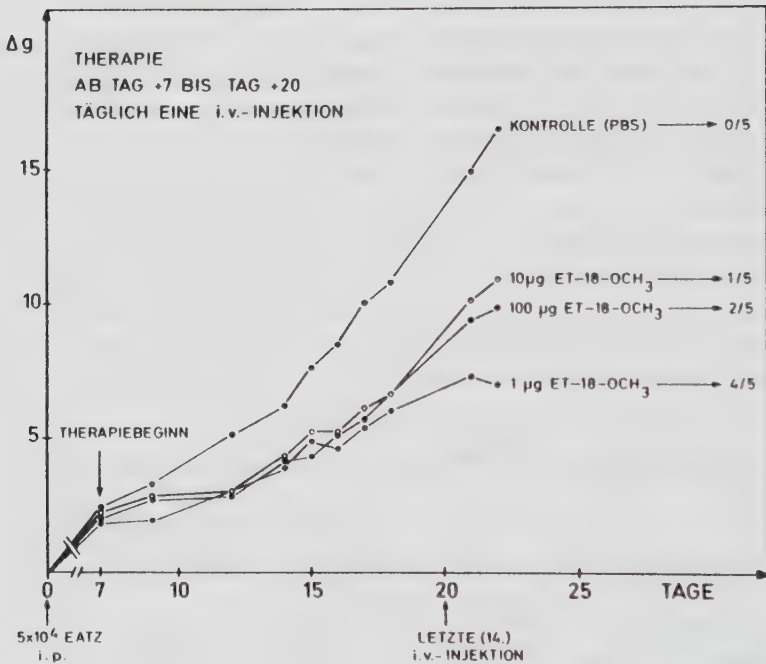


Abb. 16: Einfluß verschiedener ET-18-OCH₃-Dosierungen auf das Wachstum des EAT.
Tumorzellzahl: 5×10^4 EATZ

Abb. 16 zeigt die Therapie mit verschiedenen Konzentrationen von ET-18-OCH₃ 7 Tage nach Inokulation von 5×10^4 EATZ. Überraschend ist auch bei diesem Versuch, daß die tägliche Injektion von 1 μg ET-18-OCH₃ den besten Erfolg hat. Dies gilt auch für den Versuch in Abb. 17, bei dem 1×10^5 EATZ, also die 10-fach höhere der sonst üblichen Tumorzellzahl i.p. injiziert worden war. Unverstanden bleibt die Beobachtung, daß 10 μg ET-18-OCH₃ im Gegensatz zu 1 μg erheblich schwächer wirksam sind.

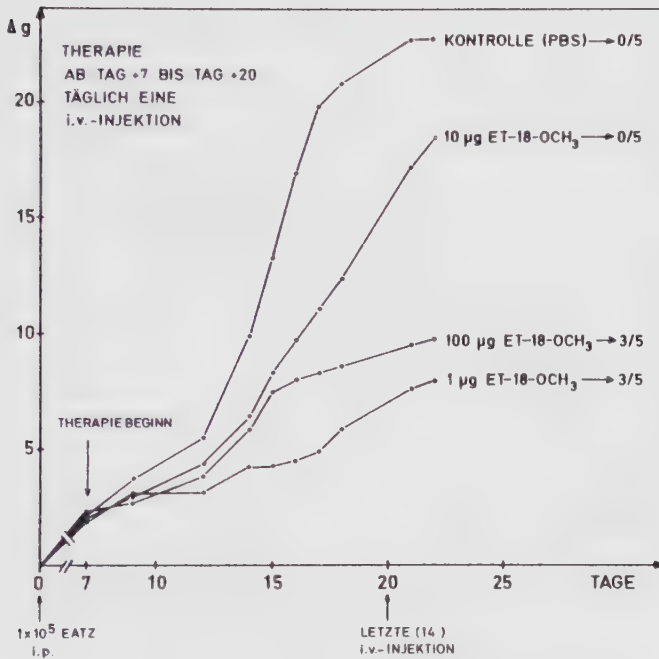


Abb. 17: Einfluß verschiedener ET-18-OCH₃-Dosierungen auf das Wachstum des EAT.

Tumorzellzahl: 1×10^5 EATZ

Wird die Tumorzellzahl auf 5×10^5 /Maus erhöht, so ist in diesem Modell die Grenze erreicht, bis zu der eine Antitumorwirkung von ET-18-OCH₃ bei jeder Konzentration beobachtet werden kann. Es treten zwar leichte Retardierungen ein, jedoch es überlebt jeweils nur ein Tier pro Gruppe, gleichgültig, mit welcher Dosierung therapiert wurde (Abb. 18).

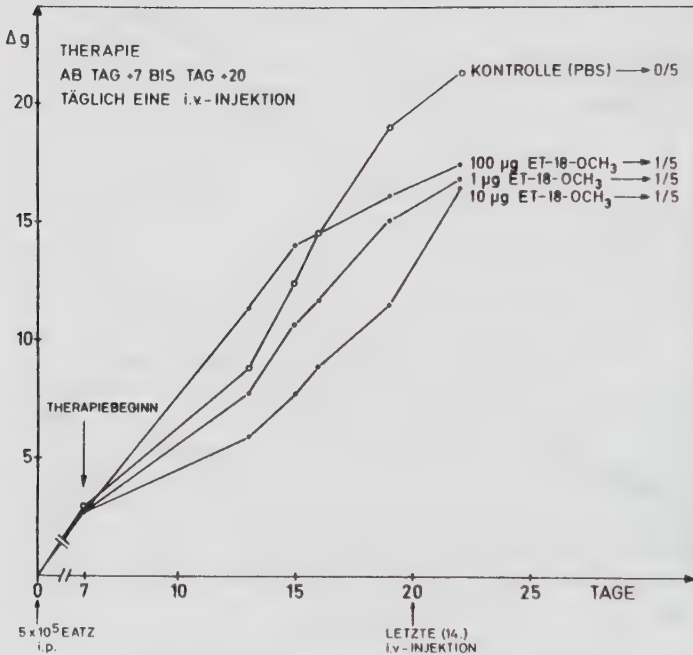


Abb. 18: Einfluß verschiedener ET-18-OCH₃-Dosierungen auf das Wachstum des EAT.

Tumorzellzahl: 5×10^5 EATZ

In Abb. 19 sind die bisher vorgestellten Ergebnisse der intravenösen ET-18-OCH₃-Therapie des EAT zusammengefaßt. Es zeigt sich, daß mit den Dosierungen von 1 bzw. 100 μg ET-18-OCH₃ Tumoralasten bis einschließlich 1×10^5 EATZ erfolgreich therapiert werden können, 10 μg ET-18-OCH₃ dagegen deutlich schwächer sind.

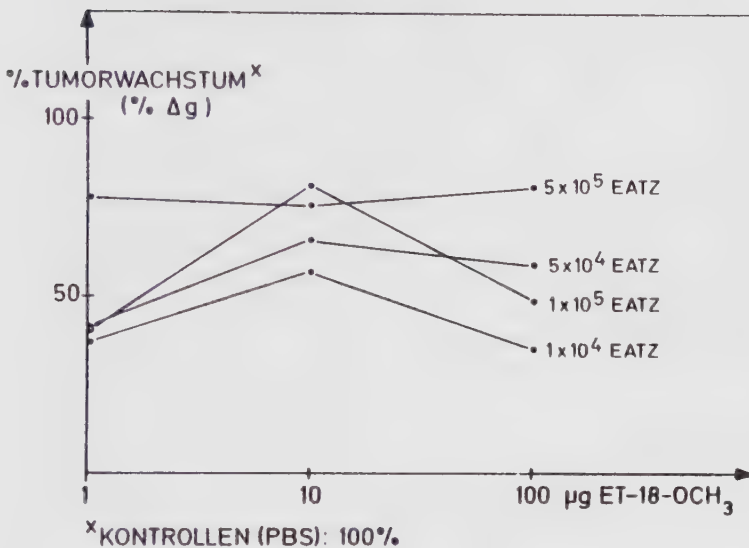


Abb. 19: Einfluß verschiedener ET-18-OCH₃-Dosierungen auf das Wachstum verschiedener Zellzahlen des EAT in NMRI-Mäusen
Therapie (i.v.): ab Tag +7

Subcutane Therapie mit ET-18-OCH₃

Unter der Annahme, daß ein erheblicher Teil der Antitumorwirkung von ET-18-OCH₃ durch die Aktivierung von Makrophagen beliebiger Herkunft vermittelt wird, wurde versucht, die im Gewebe vorhandenen Histiocyten durch Injektion von ET-18-OCH₃ zur Tumorabwehr zu aktivieren. Die Substanz wurde dabei in verschiedenen Konzentrationen s.c. oder i.c. injiziert. Daß

dies prinzipiell möglich ist, zeigt die Tatsache, daß bei s.c. oder i.c. Injektion anderer Immunpotentiatoren ein Granulom entsteht, das zu einem erheblichen Teil morphologisch und funktionell aus Makrophagen besteht.

In diesem Zusammenhang sei auf die Untersuchungen von Arnold und Mitarb.(96) verwiesen, durch die gezeigt werden konnte, daß s.c. in NMRI-Mäuse injiziertes Ätherlysolecithin am Ort der Applikation zwar noch nach Stunden vorhanden ist, sich aber dann langsam und gleichmäßig über die Zirkulation im Tierkörper verteilt.

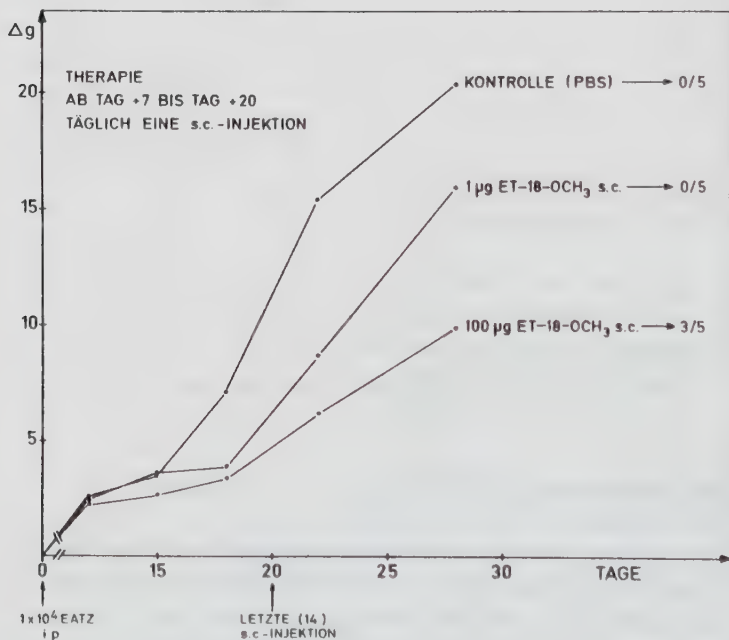


Abb. 20: Einfluß von ET-18-OCH₃ (s.c.) auf das Wachstum des EAT

Wie aus Abb. 20 entnommen werden kann, ist zwar mit 100 µg ein guter therapeutischer Effekt zu erzielen, 1 µg jedoch, das bei i.v. Therapie die besten Resultate liefert, ist in diesem Therapieschema nahezu unwirksam. Dies mag darauf beruhen, daß wie erwähnt, das Analogon zunächst depotförmig am Ort der Injektion liegen bleibt, und ein Teil davon sich dann langsam über die Zirkulation im Orgsnismus verteilt. Sowohl die Konzentration des ET-18-OCH₃ im Depot wie auch das möglicherweise zirkulierende ET-18-OCH₃ dürfte so niedrig sein, daß keine Wirkung mehr nachweisbar ist, zumal neuere Ergebnisse der Gruppe ergeben haben, daß dieses Alkyl-Lysophospholipid mit einer in vivo-Halbwertszeit von 1-2 Tagen durch Phagozyten abgebaut werden kann.

Intratumorale Therapie mit ET-18-OCH₃

Obwohl wie bereits erwähnt bei geringen Wirkdosen ($\leq$ 10 µg) eine direkte cytotoxische Wirkung aufgrund der Oberflächenaktivität der Alkyl-Lysophosphatide sehr unwahrscheinlich ist, wurde trotzdem in einigen Versuchen geprüft, inwieweit eine direkte cytotoxische Wirkung der verwendeten Substanzen durch eine direkte intraperitoneale Injektion in den i.p. wachsenden Tumor vorhanden ist.

Über die Wirkung von intratumoral geführten ET-18-OCH₃-Injektionen bei bereits manifestiertem intraperitonealen Tumor gibt Tabelle 9 Auskunft.

Tabelle 9: Einfluß von intratumoralen Injektionen (i.t.)
verschiedener LL-bzw. LLA-Dosierungen auf
das i.p. Wachstum des EAT.

DOSIS LL/LLA	TAG 0 : 1×10^4 EATZ i.p. ab TAG +7: LL/LLA i.t.	
	ÜBERLEBENDE / GRUPPE (NMRI ♀)	
10 µg ET-18-OCH ₃	1 / 5	
100 µg ET-18-OCH ₃	1 / 5	
KONTROLLE 10 µg LL	0 / 5	
KONTROLLE 100 µg LL	1 / 5	
KONTROLLE PBS	0 / 5	

* täglich über 14 Tage 1 Injektion

Obwohl täglich 10 bzw. 100 µg ET-18-OCH₃ intratumoral gespritzt wurden, kann jeweils nur ein Tier der 5-er Gruppen gerettet werden.

Die Dosierung wurde bewußt nicht höher gewählt, da die Versuchsbedingungen denen gleichen sollten, wie sie bei der i.v. bzw. s.c. Therapie verwendet worden waren.

Der Mißerfolg mag einerseits darauf beruhen, daß

1. durch die tägliche Injektion ein chronisch entzündlicher Reiz mit steriler Exsudation in der Frühphase des tumoralen Wachstums gesetzt wurde, der statt zu einer erhöhten Tumorabwehr zur verbesserten Lebensbedingungen dieser Zellen im Peritonealraum führt (s. MPC-11- und X5563-Myelom-Versuche, S. 49-53), und
2. daß dieses Exsudat, das entweder durch die Lysolecithine oder auch durch die Tumorzellen selbst induziert wird, das Lysolecithin bindet.

Dieser Versuch zeigt somit, wie auch die Versuche anderer Autoren (95), daß eine direkte cytotoxische Wirkung aufgrund der Oberflächenaktivität nahezu ausgeschlossen ist. Anders hingegen die Ergebnisse der intravenösen bzw. subcutanen Therapie: Trotz gleicher oder niedriger Lysolecithin-Dosierungen überleben bis zu 4/5 Tieren (Abb. 10-15, S. 59-66 und Abb. 20, S. 72); und dies obwohl auch bei diesen Injektionsarten mit Sicherheit angenommen werden kann, daß die Substanzen an die Lipoproteine des Serums gebunden werden.

Daraus geht nicht nur hervor, daß die Applikationsroute des ET-18-OCH₃ Analogons für den therapeutischen Effekt von ausschlaggebender Bedeutung ist, sondern vielmehr wird durch diese Resultate belegt, daß die Therapieeffekte, die bei i.v. bzw. s.c. Applikation von ET-18-OCH₃ gegen den EAT erzielt werden, tatsächlich nicht auf einer direkten Cytotoxizität dieses Analogons gegenüber den Tumorzellen beruhen können. Wie in der Diskussion näher ausgeführt wird (S. 132) liegt die begründete Annahme nahe, daß durch i.v. bzw. s.c. Injektion des Analogons eine bereits angelaufene körpereigene Abwehrreaktion gegen den aufkommenden Tumor in ihrer Wirksamkeit verstärkt wird.

3.2. MPC-11-Myelom

3.2.1. Subcutanes Tumorwachstum

I n t r a v e n ö s e T h e r a p i e

Die Therapie dieses subcutan wachsenden Neoplasmas wurde in Analogie zu den Schutzversuchen ebenfalls mit einigen ausgewählten Alkyl-Lysophosphatiden durchgeführt.

Zunächst sollte mit diesen Therapieversuchen ausgeschlossen werden, daß der Antitumoreffekt dieser Substanzen ein sogen. tumorspezifisches oder wirt-spezifisches Phänomen ist. Außerdem sind in diesem wie auch im X5563-Tumormodell Wirt und Tumorzelle syngen und der Tumor selbst wächst deutlich sichtbar sowohl s.c. wie auch i.c.. Der Verlauf des Tumorzustands ist somit immer unter sichtbarer Kontrolle.

Werden 1×10^5 Zellen des Myeloms MPC-11 Balb/c-Mäusen s.c. implantiert, so sind diese bereits nach 7 - 10-tägigem Wachstum deutlich als Knoten mit einem Durchmesser von 5 - 10 mm am Injektionsort palpabel.

Beginnt man die i.v. Therapie mit ET-18-OCH₃ oder ET-18-OH (1, 10, 100 µg täglich über 20 Tage) 4 Tage nach Implantation des Tumors, so resultieren lediglich geringfügige Retardierungen, die bei beiden Analoga bei der Dosierung von 10 µg am ausgeprägtesten sind; wird diese Dosierung beibehalten und die Tumormasse auf zunächst die Hälfte, d.h. auf 5×10^4 Zellen verringert, so kann trotz dieser Maßnahme wiederum nur eine Tumorzustandsretardierung bei den Tieren

mit ET-18-OCH₃ oder ET-18-OH erreicht werden, während die Therapie mit ET-18-OH keinerlei Unterschied zum Wachstum des Tumors in der Kontrolle bewirkt (Tab. 10).

Tabelle 10: Einfluß verschiedener langkettiger Alkyl-Lysophosphatide (i.v.) auf das s.c. Wachstum des MPC-11-Myeloms

		TAG 0: 5 x 10 ⁴ TZ (MPC-11) s.c.*						
		THERAPIE: ab Tag +4: 10 µg LLA i.v.**						

		Tumorgröße			an den Tagen			Überlebende/Gruppe
		+ 14			+ 21			(Balb/c ♀)
								am Tag + 30
LLA	MAUS	1	2	3	1	2	3	
ET-18-H		-	-	+	++	++	+++	0 / 3
ET-18-OH		+	+	+	++	++	+++	0 / 3
ET-18-OCH ₃		-	-	+	+	++	+++	0 / 3
KONTROLLE (PBS)		+	+	+	++	++	+++	0 / 3

* = s.c. rechte Axilla

** = i.v. ventral täglich 1 Injektion bis Tag +21

*** - = kein Tumor palpabel

+ = Tumor Ø bis 5 mm

++ = Tumor Ø bis 10 mm

+++ = Tumor Ø bis 20 mm

Am 14. Tag post implantationem sind 2/3 der behandelten Tiere noch ohne palpablen Tumor, während alle Kontrolltiere Tumorknoten mit einem Durchmesser bis 5 mm tragen. Bis zum 21. Tag jedoch ist so gut wie kein Unterschied mehr in der Größe der Tumoren zwischen Kontrolle und therapierten Gruppen feststellbar.

Selbst wenn die Tumorlast auf die minimale Zellzahl herabgesetzt wird, bei der ein subcutanes Angehen des Tumors in 100% der Fälle gerade noch gewährleistet ist, hat, wie in Tabelle 11 aufgeführt ist, die intravenöse Behandlung dieses subcutan in der Axilla wachsenden Myeloms nur einen geringen therapeutischen Effekt.

Tabelle 11: Einfluß verschiedener Dosierungen von ET-18-OH und ET-18-OCH₃ auf das Wachstum des MPC-11-Myeloms

TAG 0: 1 x 10 ⁴ TZ (MPC-11) s.c.*			
THERAPIE: ab Tag +4 LLA i.v.**			
LLA	1 µg	10 µg	100 µg
ET-18-OH	-	0 / 3***	1 / 3
ET-18-OCH ₃	0 / 3	1 / 3	1 / 3
KONTROLLE (PBS) 0 / 3			

* = s.c. rechte Axilla

** = i.v. bis Tag +20 täglich eine Injektion

*** = Überlebende/Gruppe (Balb/c ♀)

Intracutane Therapie

Intracutane Injektionen verschiedener langkettiger Äther-LLA bewirken ein verzögertes Auftreten des subcutan implantierten MPC-11-Tumors. Diese Verzögerung ist, wie Tabelle 12 zeigt, bei dem LLA ET-18-OCH₃ am deutlichsten.

Tabelle 12: Einfluß verschiedener langkettiger Alkyllysophosphatide (i.c.) auf das s.c. Wachstum des MPC-11-Myeloms

TAG 0: 5 x 10 ⁴ TZ (MPC-11) s.c. *									
THERAPIE: ab Tag +4: 10 µg LLA i.c. **									
LLA	Maus	Tumorgroße ***			an den Tagen			Überlebende/Gruppe	
		+ 14			+ 21			(Balb/c ♀)	am Tag + 30
		1	2	3	1	2	3		
ET-18-H		-	+	+	++	++	+++		0 / 3
ET-18-OH		-	-	+	+	++	+++		0 / 3
ET-18-OCH ₃		-	-	-	+	++	++		0 / 3
KONTROLLE (PBS)		+	+	+	++	++	+++		0 / 3

* = s.c. rechte Axilla

** = i.c. ventral täglich 1 Injektion bis Tag +21

*** = kein Tumor palpabel

+ = Tumor Ø bis 5 mm

++ = Tumor Ø bis 10 mm

+++ = Tumor Ø bis 20 mm

Dies gab Anlaß zur Frage, ob der therapeutische Effekt dieser Substanz noch vergrößert werden kann, wenn z.B. der Zeitpunkt des Therapiebeginns geändert wird, wie es bereits in ähnlichen Untersuchungen mit dem EAT oder dem Myelom X5563 mit Erfolg

durchgeführt wurde. Die Annahme, durch einen frühen Behandlungsbeginn, insbesondere ab Tag +1, den therapeutischen Effekt vergrößern zu können, konnte jedoch nicht bestätigt werden (Tabelle 13). Im Vergleich zur Kontrolle ist nur eine geringfügige Verzögerung des Tumorwachstums zu verzeichnen. Dies trifft auch für die am Tag +11 begonnene Therapie zu. Das Ergebnis zeigt, daß der Zeitpunkt für den Beginn einer wirkungsvollen Therapie zu spät ist. Hingegen sind ET-18-OCH₃-Injektionen, die ab den Tagen +5, +7 oder selbst noch ab Tag +9 gegeben werden, von einer bis zum 28. Tag nach Tumordinokulation bestehenden Retardierung gekennzeichnet. Es überlebt jedoch kein Tier, so daß der Schluß nahe liegt, daß die am Tag 0 inokulierte Tumoralast zu hoch gewählt wurde. Infolgedessen wurde eine niedere Tumoralast überimpft, die mit 1×10^4 Zellen quantitativ die unterste Grenze darstellt, bei der, wie bereits erwähnt wurde, ein subcutanes Angehen des Tumors in 100% der Fälle gerade noch garantiert ist.

Tabelle 13: Variation des Therapiebeginns mit ET-18-OCH₃

TAG 0: 5 x 10 ⁴ TZ (MPC-11) s.c. THERAPIE: 10 µg ET-18-OCH ₃ i.c.													
THERAPIE- BEGINN AM TAG	TUMORGRÖSSE *** AN DEN TAGEN						ÜBERLEBENDE / GRUPPE (BALE/c ♀) AM TAG + 35						
	+ 14			+ 20			+ 28						
	MAUS	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
+ 1	++	+	-	++	++	+	++++	+++	+++	+++	0 / 3		
+ 3	++	-	-	++	-	++	++++	++	+++	+++	0 / 3		
+ 5	-	-	-	-	++	++	+	+++	+++	+++	0 / 3		
+ 7	-	-	-	-	-	+	-	-	+++	+++	0 / 3		
+ 9	-	-	++	-	-	++	++	+	+++	+++	0 / 3		
+ 11	++	+	-	++	++	+	+++	++++	+++	+++	0 / 3		
KONTROLLE (PBS)	++	+	+	+++	++	++	++++	++++	+++	+++	0 / 3		
* = s.c. rechte Axilla ** = i.c. ventral täglich 1 Injektion bis Tag +28 *** - = kein Tumor palpabel + = Tumor Ø bis 5 mm ++ = Tumor Ø bis 10 mm +++ = Tumor Ø bis 20 mm ++++ = Tumor Ø > 20 mm													

Unter Beibehaltung der LLA-Dosierung von 10 μg ET-18- OCH_3 wurde mit der Therapie an den Tagen +5, +7 und +9 begonnen. Über den Verlauf und Ausgang dieser Untersuchungen geben die in Tabelle 14 aufgestellten Daten näher Auskunft: Es zeigt sich, daß trotz verringerter Tumorlast kein signifikanter Unterschied in der Anzahl überlebender Tiere zwischen Versuchsgruppe und Kontrolle vorliegt. Das Tumorwachstum ist nur in einzelnen Fällen retardiert, anfänglich liegt sogar bei den tumorpositiven Tieren der Versuchsgruppe bereits ein größerer Durchmesser des Tumors vor als in der Kontrolle (s. Tag +18).

Zusammenfassend ergibt sich, daß bei intravenöser als auch intracutaner Injektion der synthetischen Äther-LLA ET-18-H, ET-18-OH und insbesondere von ET-18- OCH_3 der therapeutische Einfluß auf das subcutane Wachstum des MPC-11-Tumors trotz Berücksichtigung der Parameter wie Therapiebeginn und Tumorlast bzw. LLA-Dosis lediglich auf Retardierungen des Tumorwachstums oder geringen Überlebenszahlen beschränkt bleibt.

Tabelle 14: Einfluß von ET-18-OC₃ (i.c.) auf das s.c. Wachstum des MPC-11-Myeloms

TAG 0: 1 x 10⁴ TZ (MPC-11) s.c. THERAPIE: 10 µg ET-18-OC₃ i.c.														
THERAPIE- BEGINN AM TAG	TUMORGRÖSSE			AN DEN TAGEN			UBERLEBENDE / GRUPPE (BALB/c ♀)							

	+ 18			+ 23			+ 30			AM TAG + 35				
	MAUS	1	2	3	1	2	3	1	2	3				
+ 5	-	-	++		+	-	++	++	+	+++	0 / 3			
+ 7	-	++	++		-	++	++	-	++	+++	1 / 3			
+ 9	-	++	++		-	++	++	-	++	+++	1 / 3			
KONTROLLE (PBS)	+	+	+		++	++	++	+++	+++	+++	0 / 3			

* = s.c. rechte Axilla

** = i.c. ventral täglich 1 Injektion bis Tag +28

*** - = kein Tumor palpabel

++ = Tumor ø bis 5 mm

+++ = Tumor ø bis 10 mm

+++ = Tumor ø bis 20 mm

3.2.2. Intracutanes Tumorstadium

S u b c u t a n e T h e r a p i e

Das MPC-11-Myelom wurde auf der Ventralseite von Balb/c-Wirtsmäusen intracutan transplantiert.

Wachstumsstudien zeigten, daß ein mit 1×10^4 Zellen intracutan übertragener Tumor noch in 100% der Fälle angeht. Die mediane Lage des Tumors ermöglichte die s.c. Injektion von ET-18-OCH₃ sowohl in die Axilla als auch in die Inguinalregion, ohne daß befürchtet werden mußte, daß das injizierte LLA mit dem wachsenden Tumor direkt in Berührung kommt. In dieser Versuchsanordnung zeigte sich, daß die Therapie eines i.c. wachsenden Tumors mit ET-18-OCH₃ äußerst wirkungsvoll ist (Tab. 15).

Gleichgültig, ob ab Tag +5 oder ab Tag +7 therapiert wird, es überleben jeweils 50% der Tiere. Das Erscheinen des Tumors ist aufgrund der Behandlung sehr stark verzögert. Am Tag +17 kann bei allen therapierten Tieren noch kein Tumor palpiert werden, während bereits über die Hälfte der Kontrolltiere tumorpositiv ist (+ und ++, Tab. 15).

Bis zum 28. Tag nach Tumordinokulation ist der Tumordurchmesser bei allen Kontrolltieren bis zu 20 mm und mehr angewachsen. Dies ist bei keinem der mit ET-18-OCH₃ behandelten Versuchstiere der Fall. Der Tumordurchmesser beträgt bei einigen von ihnen zu diesem Zeitpunkt bis zu 10 mm oder ist überhaupt noch nicht palpabel.

O r a l e T h e r a p i e

Aus Parallelversuchen von Kollegen an einem anderen Tumorsystem gab es Hinweise, daß Alkyl-, aber nicht Acyl-Lyso-phospholipide auch bei oraler Gabe eine Antitumorwirkung haben (Munder, pers. Mitt.). Daher wurde untersucht, ob das Wachstum des MPC-11-Myeloms durch oral appliziertes ET-18-OCH₃ zu beeinflussen ist. Mit einer Schlundsonde wurde täglich ab Tag +1 oder Tag +7 jeweils 1, 10, 50 oder 100 µg ET-18-OCH₃ 35 Tage lang zugeführt.

Tabelle 16: Einfluß von ET-18-OCH₃ (oral) auf das i.c. Wachstum des MPC-11-Myeloms

TAG 0 : 1×10^4 TZ (MPC-11) i.c.					
THERAPIEBEGINN AM TAG	PBS ORAL* (KONTROLLE)	ET-18-OCH ₃ ORAL*			
		1 µg	10 µg	50 µg	100 µg
+ 1	3/10**	5/10	7/10	10/10	7/10
+ 7	-	6/10	9/10	9/10	7/10

* = BIS TAG + 35 TÄGLICH EINE ORALE APPLIKATION

** = ÜBERLEBENDE/GRUPPE (BALB/c ♀)

Wie Tabelle 16 zeigt, ist es tatsächlich möglich, selbst durch orale Gabe von nur $1 \mu\text{g}$ ET-18-OCH₃ das Wachstum des Myeloms drastisch zu hemmen. Dabei ist das Myelom bei einigen Tieren während der Therapie zunächst angewachsen, doch dann bei einer Tumorgröße von etwa 10 mm Durchmesser langsam vollständig regrediert (Abb. 21).

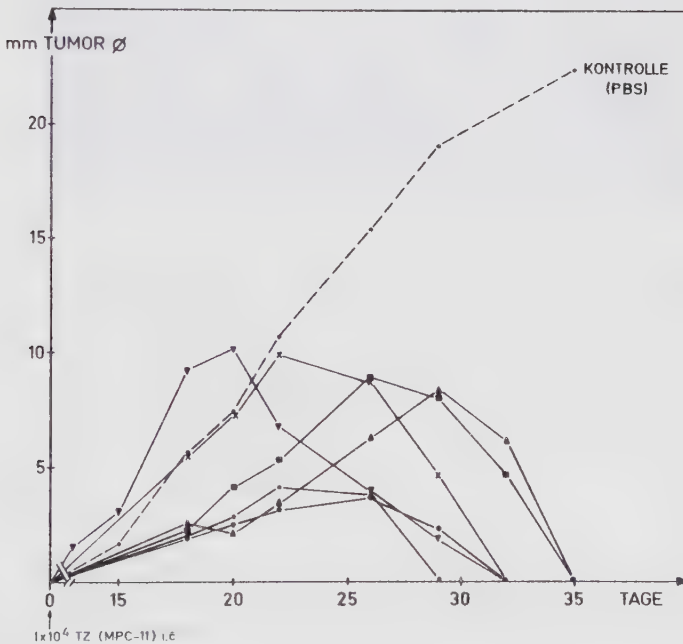


Abb. 21: Wachstum und Regression des MPC-11-Myeloms während oraler Therapie mit ET-18-OCH₃ (s. Tab. 16, S. 86)

Allerdings muß darauf hingewiesen werden, daß in der Kontrollgruppe nicht alle Tiere einen Tumor bekamen. Trotzdem ist der Effekt hoch signifikant. Somit erweist sich dieser Applikationsweg als äußerst wirkungsvoll, wobei es gleichgültig ist, ob ab Tag +1 oder ab Tag +7 mit der Therapie begonnen wird. Es zeigt sich auch hier wiederum kein lineares Dosis-Wirkungsverhältnis; die optimale Dosierung liegt bei 50 µg ET-18-OCH₃. Wie auf S. 98 dargestellt wird, ist diese Dosierung bei oraler Gabe von ET-18-OH auch beim Myelom X5563 therapeutisch sehr wirkungsvoll.

Ein Beispiel einer Totalregression des MPC-11-Myeloms während der Therapie mit ET-18-OCH₃ ist in den Abb. 22 und 23 dargestellt. Wie erwähnt konnte das Angehen und weitere Tumorwachstum trotz oraler Therapie zunächst nur teilweise verzögert, jedoch nicht gänzlich verhindert werden. Die Tumorknoten erscheinen stark durchblutet.

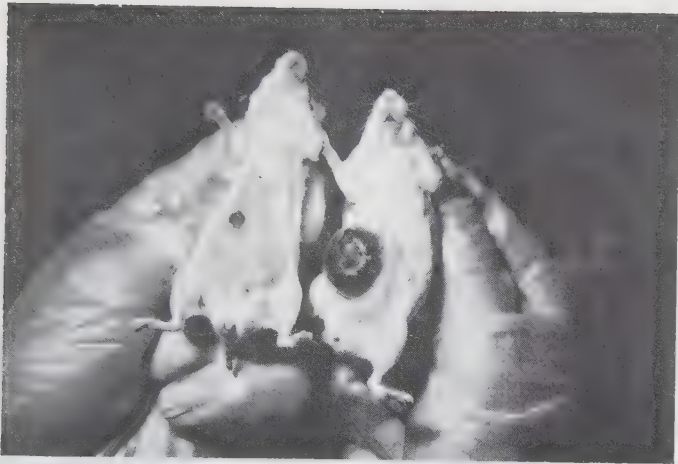


Abb. 22: Einfluß von ET-18-OCH₃ (oral) auf das i.c. Wachstum des MPC-11-Myeloms.

Die linke Balb/c-Maus wurde ab Tag +7 täglich mit 50 µg ET-18-OCH₃ behandelt.

Das Kontrolltier rechts erhielt Kochsalzlösung. Die Aufnahme wurde am 28. Tag nach Tumorinokulation gemacht.

Im weiteren Verlauf der Therapie vermindert sich die Durchblutung jedoch immer mehr, die Tumoren werden weißlich-blaß im Aussehen, verlieren zusehends an Durchmesser und beginnen z.T. zentral nekrotisch zu werden, so daß sie zwischen dem 29. und 35. Tag nach Tumorinokulation völlig remittiert sind (Abb. 21-23). Es bleiben danach nur noch verkrustete und nekrotische Reste übrig, die abfallen, so daß die Tiere vollkommen tumorfrei sind, während die

Kontrolltumoren zu diesem Zeitpunkt Walnußgröße und mehr erreichen.

Nebenwirkungen der LLA-Applikation während und nach dem Behandlungszeitraum sind - soweit es das äußere Erscheinungsbild und das Verhalten der Tiere betrifft - nicht aufgetreten.



Abb. 23: Die Nahaufnahme zeigt, daß der Tumor des mit ET-18-OCH₃ therapierten Tieres (s. Abb. 22) total remittiert ist.

Alle Kontrolltiere sind dagegen an ihrem Tumor gestorben.

3.3. X5563-Myelom

Die bereits im Abschnitt II (Material und Methoden) erwähnte Ähnlichkeit des Plasmazelltumors X5563 der Maus in Histologie, Serologie und Pathologie zu menschlichen multiplen Myelomen lässt die Therapie dieses Mäusetumors besonders attraktiv erscheinen.

Intravenöse und intracutane Therapie

In den Tabellen 17 und 18 ist der Einfluss von ET-18-OH und ET-18-OCH₃ auf das s.c. Wachstum von 1×10^5 Myelomzellen dargestellt. Wie der Versuchsablauf innerhalb der einzelnen Gruppen zeigt, liegt gegenüber der Kontrolle eine deutliche Retardierung des Tumorstwachstums vor; sie ist in den mit 50 µg ET-18-OH bzw. 10 µg ET-18-OCH₃ intravenös therapierten Tieren am stärksten (Tab. 17). Dies trifft auch für die Gruppen des Intracutan-Versuches zu, die mit 10 µg ET-18-OH bzw. 50 µg ET-18-OCH₃ behandelt wurden (Tab. 18). Während in der Kontrolle am Tag +10 bereits alle Tiere deutlich palpable Tumoren besitzen, sind nahezu alle Tiere der Versuchsgruppen zu diesem Zeitpunkt ohne palpable Tumoren. Zu Versuchsende am Tag +35 unterscheiden sich die Anzahlen überlebender Tiere trotz unterschiedlicher Behandlung der Gruppen (ET-18-OH, ET-18-OCH₃, i.v., i.c. und verschiedene Konzentrationen) jedoch kaum voneinander.

Tabelle 17: Einfluß von verschiedenen langkettigen Alkyl-Lysophosphatiden
(i.v.) auf das Wachstum des Myeloms X5563
Tumorkinokulum: 1 x 10⁵ Zellen

TAG 0: 1 x 10 ⁵ TZ (X5563) s.c.*					
i.v.-THERAPIE AB TAG +1 BIS TAG +20 MIT:					
10 µg		50 µg		100 µg	
ERGENIS	AM TAG	ERGENIS	AM TAG	ERGENIS	AM TAG
LLA	+ 10 + 15 + 20 + 35	+ 10 + 15 + 20 + 35	+ 10 + 15 + 20 + 35	+ 10 + 15 + 20 + 35	
ET-18-OH	4/5 ^{**} 1/5 1/5 1/5	5/5 3/5 2/5 1/5	5/5 3/5 2/5 1/5	5/5 1/5 1/5 0/5	
ET-18-OCH ₃	4/5 2/5 1/5 1/5	2/4 0/4 0/4 0/4	2/4 0/4 0/4 0/4	3/5 2/5 2/5 1/5	
KONTROLLE	0/7 0/7 0/7 0/7				

* = s.c. rechte Axilla

** = makroskopisch tumorfreie Tiere/Gruppe (C3Hf ♀)

Tabelle 18: Einfluß von verschiedenen langkettigen Alkyl-Lysophosphatiden
(i.c.) auf das Wachstum des Myeloms X5563
Tumorkinokulum: 1×10^5 Zellen

TAG 0: 1×10^5 T2 (X5563) s.c.*									
i.c.-THERAPIE AB TAG +1 BIS TAG +20 MIT:									
		10 µg			50 µg			100 µg	
		ERGEBNIS	AM	TAG :	ERGEBNIS	AM	TAG :	ERGEBNIS	AM TAG :
LLA		+ 10	+ 15	+ 20 + 35	+ 10	+ 15	+ 20 + 35	+ 10	+ 15 + 20 + 35
ET-18-OH	**	5/5	3/5	2/5 1/5	4/4	1/4	0/4 0/4	4/5	1/5 1/5 1/5
ET-18-OCH ₃		3/5	3/5	1/5 1/5	5/5	3/5	2/5 1/5	5/5	0/5 0/5 0/5
KONTROLLE		0/7	0/7	0/7 0/7					

* = s.c. rechte Axilla

** = makroskopisch tumorfreie Tiere/Gruppe (C3Hf ♂)

Das Inokulum von 1×10^5 Myelomzellen ist wahrscheinlich zu groß, so daß es zu diesem schnellen Tumorstadium kommt. Trotzdem tritt gegenüber der Kontrolle eine hochsignifikante Hemmung des Tumorstadiums ein; bis zum Tag +35 überleben jedoch nur wenige Tiere.

Die Vermutung, daß dieses Tumorstadium zu groß ist, wird durch den Versuch in Tabelle 19 bestätigt, in dem durch Herabsetzen der inokulierten Zellzahl auf 5×10^4 Myelomzellen ein guter therapeutischer Erfolg erzielt werden kann. Auch bei diesem Versuch zeigt sich eine zeitliche Grenze, bis zu der man mit der Therapie warten kann. Beginnt man die Therapie mit $10 \mu\text{g ET-18-OCH}_3$ am Tag +1, wird das beste Ergebnis erzielt. Der Therapiebeginn kann selbst noch nach einem 7-tägigen oder gar 11-tägigen Tumorstadium erfolgen, denn es überleben ebenfalls mehr als die Hälfte der Tiere, während der Therapiebeginn ab Tag +15 wie bei den Ehrlich Ascites Tumor-Versuchen zu spät ist (s. Abb.12 S. 62).

In Tabelle 20 wird ein Versuch wiedergegeben, in dem unter Benutzung der optimalen Tumorzellkonzentration von 5×10^4 Myelomzellen die i.c. bzw. i.v. Therapie mit nur $1 \mu\text{g}$ ET-18-OCH₃ einander gegenübergestellt sind. Eindeutig zeigt die Tabelle, daß die intracutane Applikation therapeutisch erfolgreicher ist.

Auch hier zeigt sich, daß eine erfolgreiche intracutane Therapie selbst mit $1 \mu\text{g}$ ET-18-OCH₃ noch nach einem 9-tägigen Tumorwachstum begonnen werden kann.

Tabelle 20: Einfluß von 1 µg ET-18-OCH₃ (i.c./i.v.) auf das

Wachstum des Myeloms X5563

Tumorkinokulum: 5 x 10⁴ Zellen

TAG O: 5 x 10⁴ TZ (X5563) s.c. THERAPIE: 1 µg ET-18-OCH₃									
THERAPIE- BEGINN	**			**			**		
	i.c.			i.v.			i.v.		
AM TAG	ERGEBNIS AM TAG :			ERGEBNIS AM TAG :			ERGEBNIS AM TAG :		
+ 3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3
+ 5	3/3	2/3	2/3	2/3	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3
+ 9	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	1/3	0/3	0/3
KONTROLLE (PBS)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

* = s.c. rechte Axilla

** = täglich über 14 Tage 1 Injektion

*** = makroskopisch tumorfreie Tiere/Gruppe (C3Hf ♀)

O r a l e T h e r a p i e

Wie die zuvor beschriebenen Versuche mit LLA in diesem Tumorsystem zeigen, ist ein Erfolg der therapeutischen Behandlung, die auf intracutanem oder intravenösem Weg geführt wird, in großem Maße von der am Tag 0 inokulierten Tumorlast abhängig. Durch die i.v. oder i.c. Behandlung eines Myeloms, das mit 1×10^5 Zellen übertragen wird, kann lediglich eine deutliche Retardierung des Tumorwachstums festgestellt werden, gleichgültig, in welcher Dosierung welches LLA appliziert wird (Tab. 17 und 18). Jedoch ist es möglich, durch orale Gabe von ET-18-OH selbst die 4-fach letale Tumorzellzahl, die den Tieren s.c. inokuliert wurde, in 70 - 80% der Fälle am Angehen zu hindern, so daß die Tiere vollkommen tumorfrei sind (Abb. 24). Andere Alkyl-Lysophosphatide müssen auf ihre Wirkung bei oraler Gabe noch überprüft werden.

Diese Resultate belegen wiederholt, daß dem Applikationsweg der LLA entscheidende Bedeutung in der Einflußnahme auf das Wachstum eines Tumors zukommt.

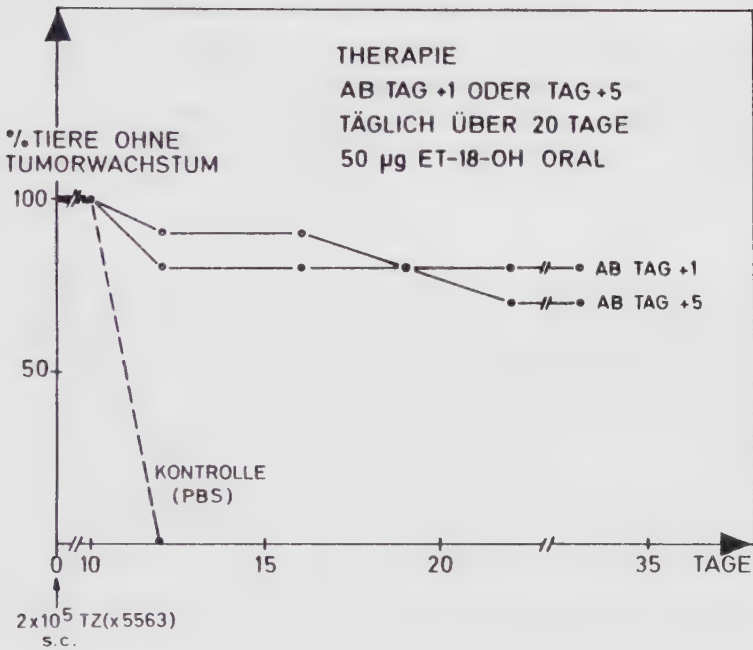


Abb. 24: Einfluß von ET-18-OH (oral) auf das Wachstum des Myeloms X5563
Tumordinokulum: 2×10^5 Zellen
10 C3Hf (♂) /Gruppe

4. Wirkungsmechanismus

Durch die Ergebnisse der aufgeführten Versuchsreihen in den drei experimentellen Tumorsystemen EAT, Myelom X5563 und Myelom MPC-11 kann eine antitumorale Wirksamkeit der verwendeten synthetischen LLA bei tumorprophylaktischer als auch tumortherapeutischer Anwendung als gesichert angesehen werden.

Weitere Untersuchungen galten daher der Frage zum Wirkungsmechanismus dieser Substanzen. Falls die LLA ihren Einfluß tatsächlich über das immunologische Abwehrsystem entfalten und auf diese Weise das Tumorstadium beeinflussen, dann sollten sich die Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der LLA auf die immunkompetenten Zellen des Organismus richten, die die adjuvante Wirkung möglicherweise vermitteln. Prinzipiell stellen sich bei der Frage nach einem immunologischen Verstärkermechanismus 3 Probleme:

1. Wird die Tumoralabwehr durch die vermehrte Bildung von tumorspezifischen Antikörpern vermittelt ? (Stimulation der B-Lymphocyten ?)
2. Wird das T-Lymphocytensystem stimuliert, so daß mehr und bessere spezifische T-Killerzellen entstehen ?
3. Kommt es durch LLA zur verstärkten Proliferation und erhöhten Abwehraktivität von Makrophagen ?

Schon aus methodischen Gründen waren nicht alle aufgeführten Aspekte experimentell zu beantworten. So ist z.B. der Nachweis von Antikörpern gegen die meisten Tumoren äußerst schwierig.

4.1. Bedeutung der Antikörper für die Antitumorwirkung der LLA

Es wurde untersucht, ob nach Ausschaltung des antikörperbildenden B-Zellkompartments die Wirksamkeit von ET-18-OCH₃ erhalten bleibt. Dies geschah durch Ganzkörperbestrahlung bzw. Cyclophosphamidbehandlung.

Ganzkörperbestrahlung

Zwei Tage vor intraperitonealer Gabe von 1000 µg ET-18-OCH₃ am Tag -4 wurden NMRI-Mäuse mit der subletalen Röntgendosis von 450 R ganzkörperbestrahlt. Durch 450 - 500 R werden vor allem die radiosensiblen B-Lymphocyten getroffen (103), während T-Lymphocyten und Makrophagen radioresistenter sind (103, 104).

Es zeigte sich, daß die mit 1000 µg ET-18-OCH₃ am Tag -4 induzierten Peritonealexsudatzellen noch 100%ig in der Lage sind, das Angehen von 1×10^4 EATZ zu verhindern. Dies ist in Abb. 25 dargestellt, in der der prozentuale Anteil der Tiere ohne Tumorwachstum gegen die Zeit aufgetragen ist.

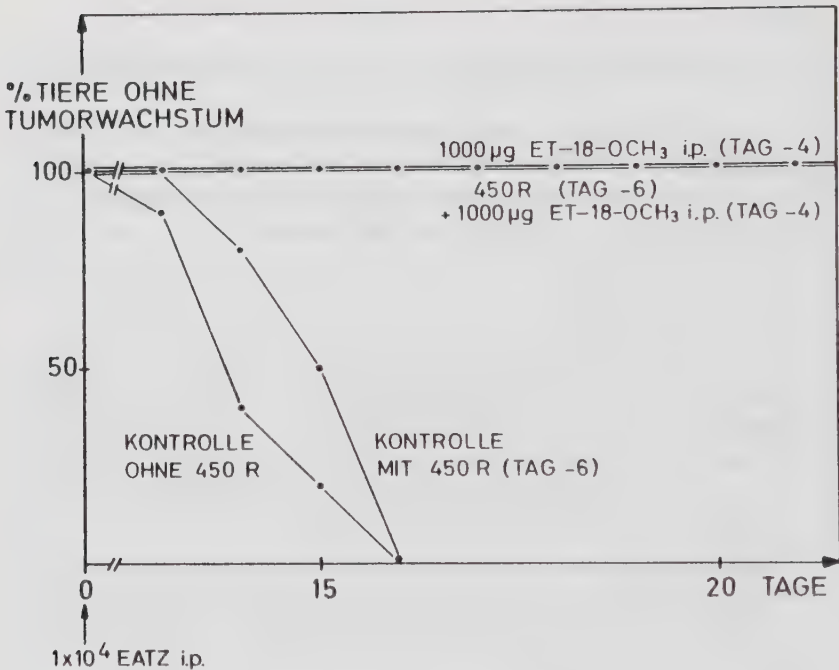


Abb. 25: Einfluß einer subletalen Ganzkörperbestrahlung auf die durch ET-18-OCH₃ vermittelte Tumorphylaxe.

Ganzkörperbestrahlung vor ET-18-OCH₃-Behandlung
10 NMRI-Mäuse (♀)/Gruppe

Während die Kontrollen ohne bzw. mit 450 R bereits am 16. Tag vollständig Tumor zeigen, ist in den beiden anderen Gruppen eine 100%ige Hemmung des Tumorwachstums vorhanden, was sich graphisch als Parallele zur Abszisse darstellt. Diese Tiere waren selbst noch nach 60 Tagen tumorfrei; darüber hinaus waren alle in der Lage, ein erneutes, 5-fach höheres Tumorkinokulum abzustößen, so daß sie als geheilt und tumorresistent angesehen werden konnten. Die Applikation

von 1000 μg ET-18- OCH_3 schützte die Tiere nicht nur bei der ersten Injektion, sondern ermöglichte trotz der relativ hohen Strahlendosis die Entwicklung eines immunologisch spezifischen Gedächtnisses.

Im zweiten Versuch wurden NMRI-Mäuse 2 Tage nach der i.p. Injektion von 1000 μg ET-18- OCH_3 mit 450 R subletal ganzkörperbestrahlt. Auch hier zeigt sich, wie in der Untersuchung zuvor, dasselbe Bild (Abb. 26).

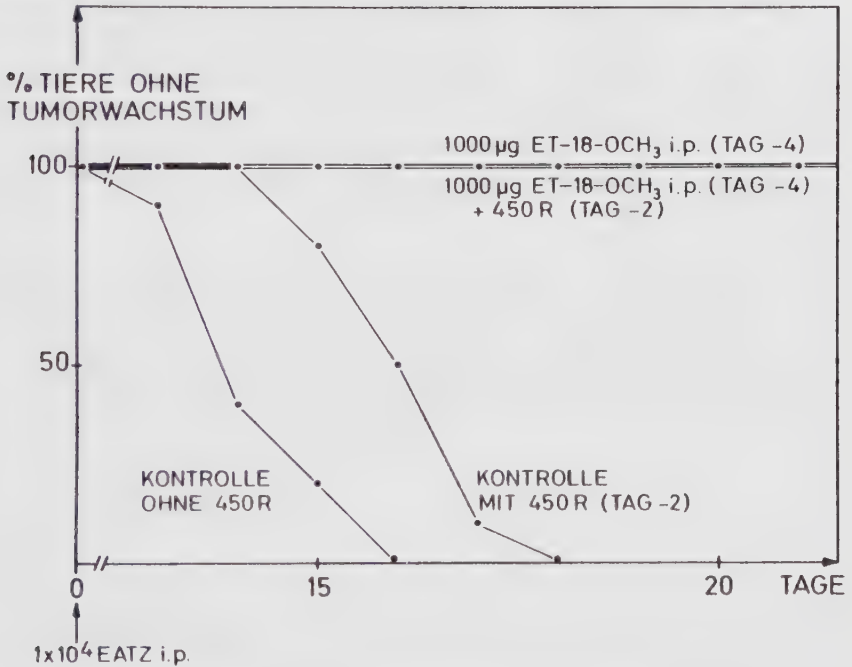


Abb. 26: Einfluß einer subletalen Ganzkörperbestrahlung auf die durch ET-18- OCH_3 vermittelte Tumorphylaxe.

Ganzkörperbestrahlung nach ET-18- OCH_3 -Behandlung
10 NMRI-Mäuse ($\varnothing$)/Gruppe

Es ist kein Effekt der 450 R auf die durch ET-18-OCH₃ induzierten Peritonealexsudatzellen feststellbar. Alle Tiere zeigen im Gegensatz zu den Kontrollen eine 100%ige Hemmung des Tumorwachstums. Dieser Befund bestätigt zusätzlich, daß die Beteiligung des B-Zellkompartments am Zustandekommen des antitumoralen Lysolecithin-Effektes ohne entscheidende Bedeutung ist.

Bei beiden Versuchen fällt auf, daß die bestrahlten Kontrolltiere gegenüber den unbestrahlten Kontrolltieren ein leicht verzögertes Tumorwachstum zeigen. Dies ist der bereits früher beschriebene adjuvante Effekt der Bestrahlung, der möglicherweise durch Nukleotide vermittelt wird (105).

Um abzusichern, daß die Bildung möglicher spezifischer Tumorantikörper durch eine Ganzkörperbestrahlung von 450 R ausgeschaltet werden kann, wurde zur Bestätigung dieser Behauptung die humorale Antikörperantwort gegen Schafererythrozyten gemessen.

Tabelle 21: Einfluß einer subletalen Ganzkörperbestrahlung auf die Plaque-Bildung von NMRI-Mäusen gegen Schaferythrozyten

TAG + 5 : PFC / MILZ GEGEN SRBC [*]		
Maus Nr.	ohne 450 R	mit 450 R ^{**}
1	139 000	3 800
2	176 000	800
3	210 000	1 200
4	92 000	4 600
5	159 000	2 800
	$\bar{x} = 155\ 300$	$\bar{x} = 2\ 600$
	$\sigma = 44\ 000$	$\sigma = 1\ 633$

* = SRBC Injektion: 3 Stunden nach Bestrahlung 40×10^6 SRBC i.v.

** = Ganzkörperbestrahlung am Tag 0

$\bar{x}$ = Mittelwert

σ = Standardabweichung

Wie der funktionelle Test in Tabelle 21 zeigt, wird bei einer Strahlendosis von 450 R die Antikörperbildung vollständig unterdrückt. Die Tiere sind im Plaque-Test nicht mehr imstande, auf injizierte Schaferythrozyten humoral zu antworten, obwohl bekannt ist, daß Schaferythrozyten einen starken antigenen Reiz auf das B-Zellsystem ausüben.

Cyclophosphamid

Ein weiterer Beweis, daß antikörperbildende Zellen keine entscheidende Rolle in der Antitumorwirkung der Lysolecithin-Analoga spielen, wurde durch Versuche mit Cyclophosphamid erbracht. Durch die Behandlung mit Cyclophosphamid werden vor allen Dingen selektiv die Zellen des humoralen Immunsystems getroffen (106).

Wie auf den Abb. 27 und 28 zu sehen ist, wurden in gleichen experimentellen Ansätzen die Ergebnisse der Bestrahlungsversuche durch Cyclophosphamid-Behandlung von jeweils 4000 µg vor bzw. nach Induktion der Peritonealexsudatzellen bestätigt. In Abb. 27 ist die Behandlung mit Cyclophosphamid zwei Tage vor Induktion der Peritonealexsudatzellen dargestellt. Es

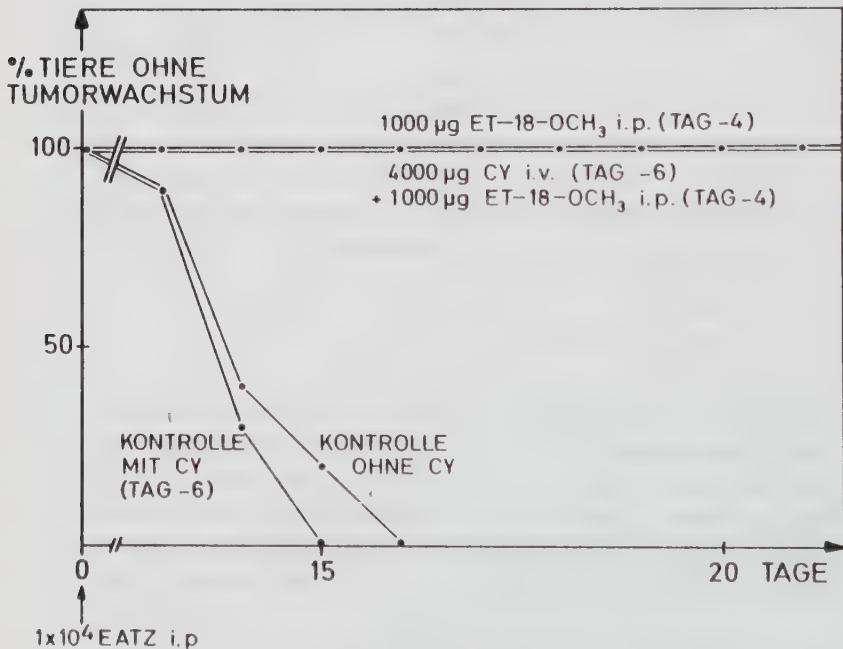


Abb. 27: Einfluß von Cyclophosphamid auf die durch ET-18-OCH₃ vermittelte Tumorphylaxe.

Cyclophosphamid-Behandlung vor ET-18-OCH₃-Behandlung
10 NMRI-Mäuse (φ)/Gruppe

zeigt sich dasselbe Resultat wie es auch in den Ansätzen mit 450 R erreicht wurde: Alle Kontrolltiere zeigen Tumor, wohingegen alle Versuchstiere tumorfrei sind. Das Ergebnis der Behandlung mit Cyclophosphamid 2 Tage nach Induktion der Peritonealexsudatzellen ist in Abb. 28 dargestellt.

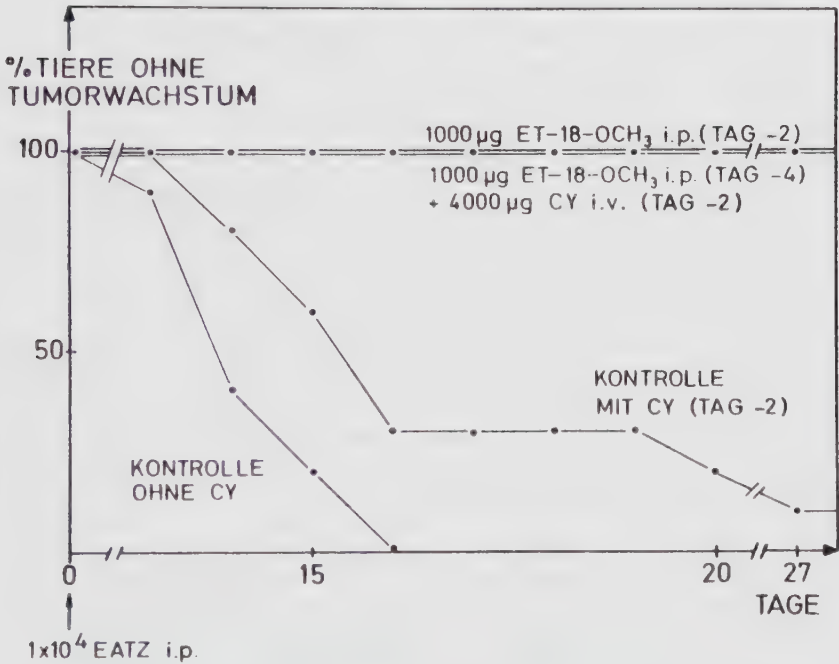


Abb. 28: Einfluß von Cyclophosphamid auf die durch ET-18-OCH₃ vermittelte Tumorphylaxe
Cyclophosphamid-Behandlung nach ET-18-OCH₃-
Behandlung
10 NMRI-Mäuse (♀)/Gruppe

Auch hier zeigt sich wiederum das gleiche Bild wie in den Ansätzen mit 450 R. Das Fehlen des B-Zellsystems macht sich also in allen 4 Ansätzen in keiner Weise bemerkbar. Die Wirkung der Lysolecithin-Analoga ist nicht aufgehoben, sondern vollständig erhalten. Alle überlebenden Tiere dieser Cyclophosphamid-Versuchsreihe wurden nach 60 Tagen nochmals mit EATZ konfrontiert. Obwohl die Tumorlast auf das 5-fache, d.h. auf 5×10^4 EATZ gesteigert wurde, waren am 90. Tag alle Tiere tumorfrei, so daß sie gegenüber diesem Tumor als immun betrachtet werden konnten.

Wie aus Abb. 28 zu sehen ist, ist das Tumorwachstum in der Kontrolle bei 30% der Tiere über mehrere Tage verzögert und bis zu Versuchsende sind es 10% der Tiere, die keinen Tumor mehr tragen. Dies ist bei keiner Kontrolle innerhalb dieser Versuchsreihe bisher der Fall gewesen (vgl. Abb. 25, 26, 27). Da das Cyclophosphamid in diesem Versuch in einem zeitlich relativ kurzen Abstand, nämlich 2 Tage vor Tumorerinokulation injiziert wurde, kann davon ausgegangen werden, daß die alkylierende Wirkung des Cyclophosphamids auch noch die am Tag 0 inokulierten Tumorzellen erfaßt.

In den bisherigen Untersuchungen erstreckte sich die Cyclophosphamidwirkung u.a. auf jene Zellpopulation, die mit einer intraperitonealen ET-18- OCH_3 -Injektion von 1000 μg 4 Tage vor Setzen des Tumors provoziert wurde. Trotz dieser Cyclophosphamidbehandlung bleibt der prophylaktische Effekt in allen Tieren, die mit ET-18- OCH_3 gespritzt wurden, gegenüber dem Ehrlich Ascites Tumor erhalten, da offenbar genügend Abwehrzellen in den Bauchraum einwandern, die sich nicht mehr in Teilung befinden. Daher können sie nicht in ihrer DNS

alkyliert werden. Ihre Abwehrfunktion bleibt erhalten. Es war deshalb von Interesse zu untersuchen, ob und in welcher Form Cyclophosphamid die therapeutische Wirksamkeit von ET-18-OCH₃ beeinflusst, wenn Cyclophosphamid nach Inokulation des Tumors gegeben wird.

Abb. 29 und 30 zeigen, daß die Kombination beider Substanzen einen synergistischen Effekt zur Folge hat.

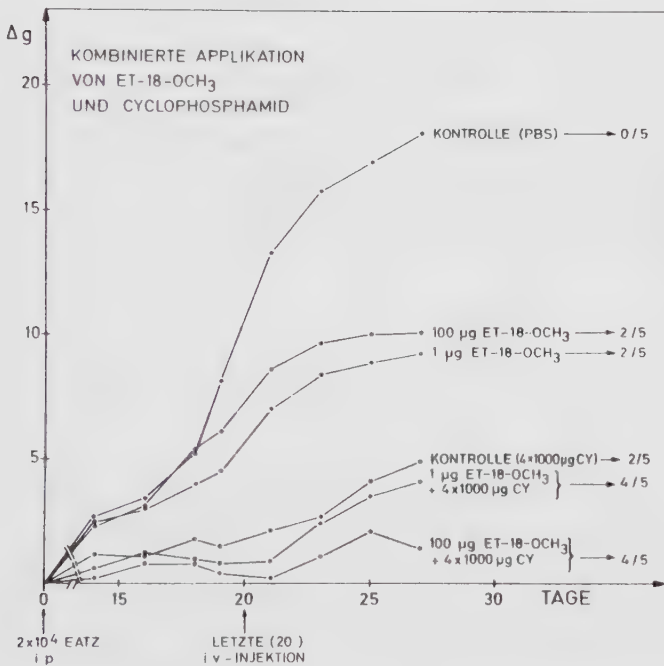


Abb. 29: Einfluß von Cyclophosphamid auf die therapeutische Wirksamkeit von ET-18-OCH₃
Cyclophosphamid-Behandlung: ab Tag +1 - +4 1000 µg i.v.
ET-18-OCH₃-Behandlung: ab Tag +1 - +20

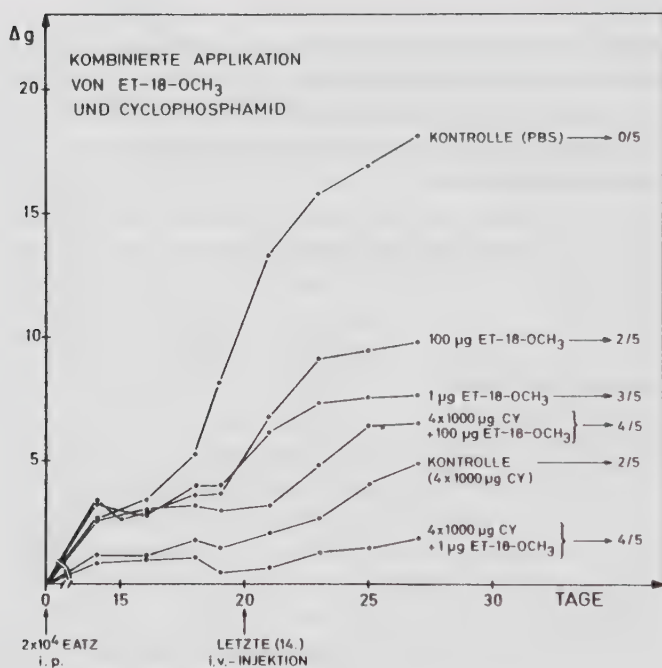


Abb. 30: Einfluß von Cyclophosphamid auf die therapeutische Wirksamkeit von ET-18-OCH₃

Cyclophosphamid-Behandlung: ab Tag +1 - +4 1000 µg i.v.

ET-18-OCH₃-Behandlung : ab Tag +7 - +20

Dieser Synergismus muß allerdings durch Versuche mit größeren Tierkollektiven bestätigt werden. Zusätzlich zeigen die Abb. 29 und 30 erneut, daß die Antikörperbildung gegen EATZ bedeutungslos für die Tumorbwehr ist.

Da die 4-malige Gabe von 1000 µg Cyclophosphamid und damit die komplette Unterdrückung des humoralen Systems in diesen Tieren den mäßigen Tumorschutz durch 1 bzw. 100 µg ET-18-OCH₃ nicht aufzuheben vermag, sondern im Gegenteil synergistisch wirkt, so können Antikörper, wie auch immer, den

Antitumoreffekt nicht vermitteln. Derartige Wirkungssynergismen konnten auch bei kombinierter therapeutischer Anwendung von BCG mit Cyclophosphamid (107) oder *Corynebacterium parvum* mit Cyclophosphamid (108) gegen andere Mäusetumoren beobachtet werden.

4.2. Bedeutung der T-Lymphocyten für die Antitumorwirkung der LLA

Um die Frage der T-Zellbeteiligung an der Vermittlung des antitumoralen Lysolecithin-Effektes zu klären, wurden Nu/Nu-Mäuse, in denen der Ehrlich Ascites Tumor bekanntlich auch wächst (s.S. 30, Abschnitt III.1.1.) in Versuch genommen. Nu/Nu-Mäuse sind kongenital thymusdefekt und stark defizient in thymusabhängigen (T)-Lymphocyten (109). Diese Defizienz der T-Zellfunktion ist in diesen Tieren so stark ausgeprägt, daß sie selbst maligne Xenotransplantate akzeptieren (110).

Nu/Nu-Mäuse wurden mit 2000 µg Lysolecithin i.p. vorbehandelt. Vier Tage danach erfolgte die i.p. Inokulation von 2×10^6 EATZ.

Falls die T-Zelle eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der antitumoralen Effekte der Lysolecithin Analoga spielen sollte, dann müßten diese durch Lysolecithin aktivierten, jedoch funktionell T-zelldefizienten Peritonealexsudatzellen aus Nu/Nu-Mäusen nicht imstande sein, den Tumor zu vernichten. Abb. 31 gibt über Verlauf und Ausgang dieses Versuches Auskunft.

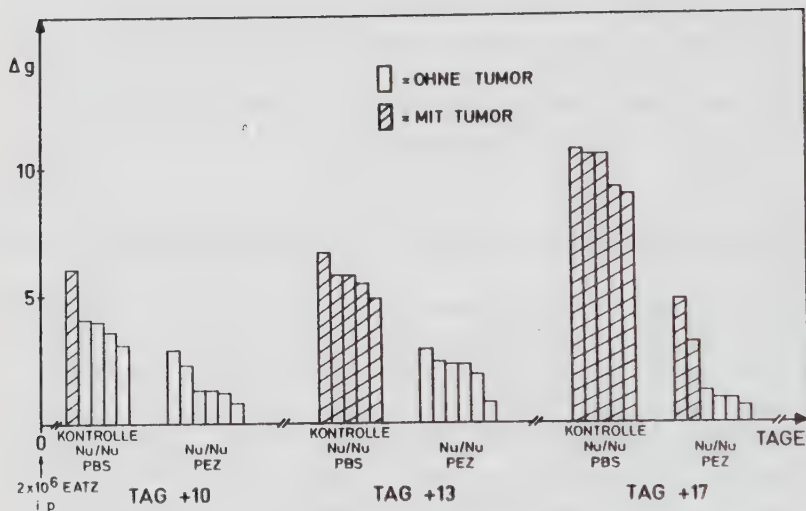


Abb. 31: Antitumorwirkung LL-aktivierter PEZ in Nu/Nu-Mäusen

Es ist aufgrund der Gewichtszunahme der Versuchstiere bis zum 13. Tag nach Überimpfen der Tumorzellen anzunehmen, daß der Tumor in diesen Tieren zwar anging, jedoch erfolgreich bis zum 17. Tag bei 4/6 Tieren abgestoßen werden konnte, was sich in dem vergleichsweise niedrigeren Gewicht äußert. In diesem Zusammenhang seien die Untersuchungen von Keller (111) und Meltzer (112) sowie Rao und Mitarb. (113) erwähnt, durch die übereinstimmend bestätigt wird, daß trotz Abwesenheit funktioneller T-Zellimmunität in Nu/Nu-Mäusen deren Peritonealmakrophagen aktiviert werden können. Zudem konnte gezeigt werden, daß keine Unterschiede in der antitumoralen Funktion aktivierter Makrophagen aus normalen bzw. thymusdefekten Nu/Nu-Mäusen bestehen (111). In Analogie zu den

Nu/Nu-Experimenten gelang es ferner Woodruff u. Mitarb. zu demonstrieren, daß thymektomierte, ganzkörperbestrahlte und mit isogenem Knochenmark rekonstituierte Mäuse ("B"-Mäuse) noch im gleichen Ausmaß wie normale Mäuse imstande sind, Tumorwachstum nach Cyclophosphamid-Behandlung zu hemmen. Überdies ist in unbehandelten "B"-Mäusen verlangsamtes Tumorwachstum konstatiert worden (114). Dieser Befund konnte auch von anderen Autoren erhoben werden (115).

Wie das Ergebnis des in Abb. 31 dargestellten Versuches belegt, können T-Zellen nicht entscheidend an der durch LLA angeregten Tumorabwehr beteiligt sein.

Die Frage nach dem zellulären Vermittler der antitumoralen LLA-Effekte konnte sich somit nur noch auf die Gruppe der Makrophagen konzentrieren. Es stellte sich dabei folgende Frage: Bleibt der antitumorale Effekt erhalten, wenn die Makrophagen entfernt oder zumindest in ihrer Funktion gestört werden ?

4.3. Bedeutung der Makrophagen für die Antitumorwirkung der LLA

Ausschaltung der Makrophagen

Bei den bisherigen Versuchen zur Bedeutung der B- und T-Zellen für die Antitumorwirkung der LLA ist es relativ einfach gewesen, beide Zelltypen experimentell zu trennen, da einerseits sowohl Cyclophosphamid wie Bestrahlung die B-Zelle spezifisch trifft, andererseits die Natur uns in Gestalt der thymusdefekten Maus ein nahezu thymuszellfreies System in vivo zur Verfügung stellt. Die Bedeutung der Makrophagen in vivo zu untersuchen ist schwierig, da sie auch durch

die massivsten Maßnahmen nicht vollständig ausgeschaltet werden können. Daher mußte in den Untersuchungen zur Rolle der Makrophagen in reine in vitro-Systeme übergegangen werden, bei denen es möglich ist, gezielt die Makrophagen auszuschalten und die so makrophagenfreien Zellsuspensionen wieder in syngene Empfänger-tiere rückzuinjizieren.

Prinzipiell stehen dabei drei Möglichkeiten zur Verfügung, um eine PEZ-Suspension makrophagenfrei zu machen:

1. durch die Carbonyleisen/Magnet-Methode,
2. indem man die Zellsuspension mit einem hochspezifischen Antimakrophagenserum oder mit anderen, für Makrophagen spezifisch toxischen Substanzen behandelt, die aber nicht zur Verfügung standen und
3. man hindert die Zellen in ihrer Abwehrfunktion, indem man sie massiv partikuläre Fremdanigene phagozytieren lässt.

Carbonyleisen/Magnet-Methode

Zunächst wurde mit Hilfe dieser Methode versucht, die Peritonealexsudatzellen makrophagenfrei zu machen:

NMRI-Mäuse wurden mit 2000 µg LL i.p. vorbehandelt, die PEZ nach 4 Tagen wie beschrieben aus dem Bauchraum gewonnen, mit Carbonyleisen versetzt und die Phagozyten, die Eisenpartikel aufgenommen hatten, dann unter Zuhilfenahme eines Magneten aus der Zellsuspension entfernt (s. Material und Methoden S.25). Diese makrophagenfreie Zellsuspension wurde dann in Empfänger-tiere injiziert, die nicht mit LL vorbehandelt worden waren. Der Versuchsablauf ist in Abb. 32 dargestellt.

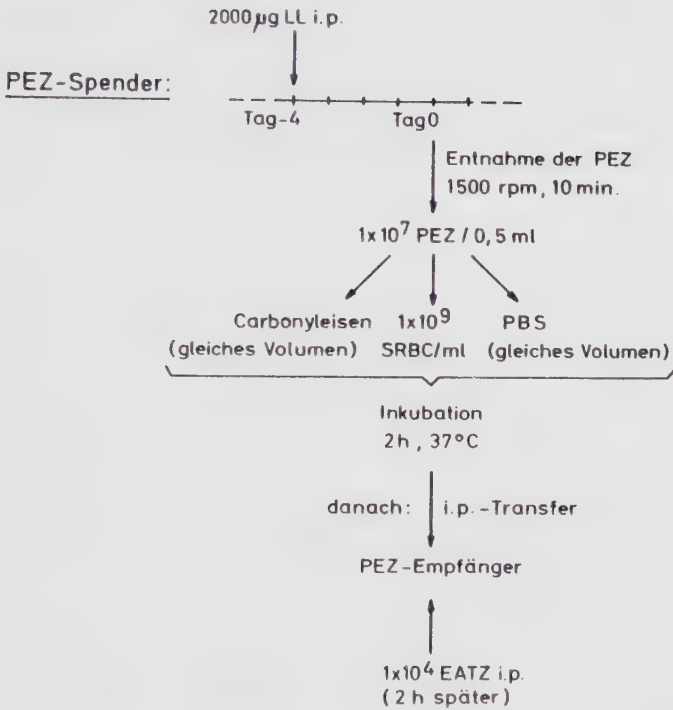


Abb. 32: Ausschaltung der Makrophagen

In einem anderen Ansatz wurde versucht, die Funktion der LL-aktivierten Peritonealmakrophagen dadurch zu hemmen, daß sie vor dem Transfer in unbehandelte Empfängertiere in vitro massiv mit einem Fremdantigen, nämlich Schaferythrozyten, inkubiert wurden, so daß die Makrophagen stark phagozytierten. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Veränderung der Antitumorwirkung LL-aktivierter Peritonealmakrophagen nach Vorbehandlung mit Carbonyleisen bzw. Schaferythrozyten

Vorbehandlung	Tag 0 : 1×10^4 EATZ i.p. **
1×10^7 PEZ/ml	Überlebende / Gruppe (NMRI ♀)
2 h inkubiert (37°C)	
mit	
Carbonyleisen	3 / 10
(gleiches Volumen)	
Schaferythrozyten	4 / 10
(1×10^9 /ml)	
PBS (Kontrolle)	7 / 10
(gleiches Volumen)	
Kontrolle (Tag -4: 2000 µg LL i.p.)	10 / 10
Kontrolle (Tag -4: 1 ml PBS i.p.)	0 / 10

* = PEZ induziert durch 2000 µg LL i.p. am Tag -4

** = 2 Stunden nach Inokulation der aktivierten PEZ

Während die Kontrollgruppe , deren PEZ nur mit PBS inkubiert wurden, 7/10 Überlebende aufweist, überleben in den anderen Gruppen, deren PEZ entweder mit Carbonyleisen oder Schaferythrozyten vorbehandelt wurden, nur 3 bzw. 4 Tiere. Daß trotzdem noch 3 - 4 Mäuse die ansich letale Tumordosis überleben, mag daran liegen, daß in der LL-induzierten PEZ-Population noch Promonocyten bzw. Promakrophagen, die aus dem Knochenmark stammen, vorhanden sind, die weder phagozytieren noch anhaften können (Munder, pers. Mitt.). Diese unreifen Zellen

erlangen in der Gewebekultur erst nach 24 - 48 Stunden das normale Aussehen und die funktionelle Reife eines Peritonealmakrophagen. Der Versuch zeigt also, daß es möglich ist, entweder durch Entfernen des Makrophagen oder durch Hemmung seiner Funktion, die durch Überfütterung der Zelle mit Fremdstanz eintritt, den Beweis zu führen, daß Makrophagen ganz entscheidend an der Vermittlung der Lysolecithinwirkung beteiligt sind.

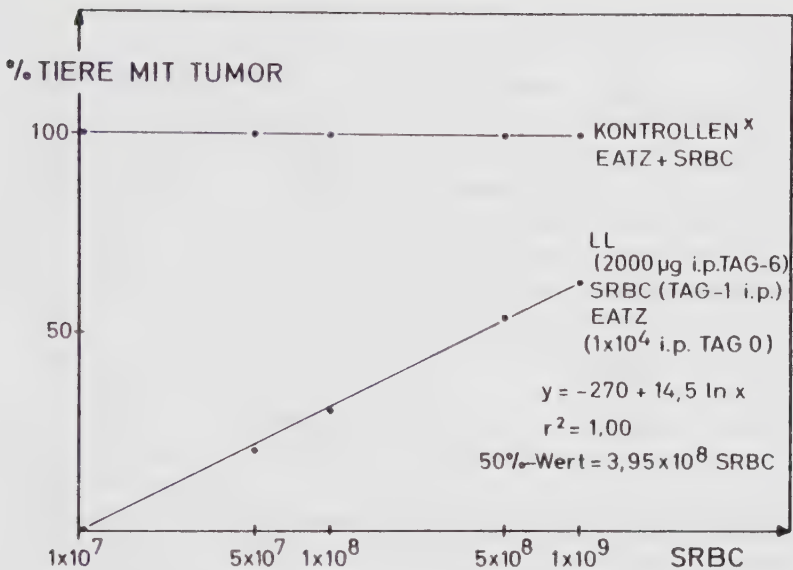
Einen positiven Beweis für die Bedeutung der Makrophagen zu führen, indem man PEZ von allen übrigen Zellen reinigt und nur die reine Makrophagenpopulation injiziert, ist experimentell sehr schwierig und kaum durchführbar, da PEZ fast nie unbeschädigt von ihrer Unterlage abgetrennt werden können. In der Zwischenzeit ist es jedoch gelungen, ausgereifte Knochenmarksmakrophagen durch Kultivation auf hydrophoben Oberflächen, auf denen sie nur ganz leicht anhaften können, rein zu isolieren. Wenn nun diese Knochenmarksmakrophagen mit Alkyllyso-phosphatiden inkubiert worden waren, dann zeigte sich, daß die so aktivierten Makrophagen tatsächlich in der Lage sind, sowohl in vitro wie in vivo Tumorzellen sehr viel effektiver zu zerstören bzw. das Wachstum im Tier zu verhindern als unbehandelte Makrophagen (98,116,146).

Phagozytose von Schaferythrozyten

Tabelle 22 zeigt, daß die nichtphagozytäre Abtötung von Tumorzellen durch die Funktion der Phagozytose des Makrophagen stark beeinträchtigt werden kann. Dieser Befund, der auch von anderer Seite erhoben worden ist (117), kann für das Verständnis des Tumorwachstums in vivo von entscheidender Bedeutung werden. Es erhebt sich die Frage, ob die unspezifische Überwachung gegen

malignes Wachstum dadurch beeinträchtigt wird, daß die am Ort der Entstehung eines Tumors zur Verfügung stehenden Makrophagen durch Phagozytose von irgendwelchem Fremdmaterial in ihrer Überwachungsfunktion beeinträchtigt werden können. So ist es durchaus denkbar, daß z.B. bei Applikation von Substanzen, die das RES massiv blockieren können, wie etwa Bacillus Calmette-Guérin, Siliciumdioxid, Corynebacterium parvum etc., aktivierte und junge Makrophagen aus dem Knochenmark in die Peripherie geschleust werden, daß aber ein erheblicher Teil dieser Makrophagen dann mit der Phagozytose des Irritans beschäftigt ist und dadurch nicht optimal die Tumorabwehr aufnehmen kann. Falls man also aktivierten Makrophagen genügend Erythrozyten zur Phagozytose anbietet und ihnen ausreichend Zeit läßt, diese aufzunehmen, so sollten sie aufgrund der intrazellulären Antigenaufbereitung oder anderer postphagozytär assoziierter Vorgänge vorübergehend nicht mehr in der Lage sein, ihre zweite Funktion als antitumorale Effektorzellen, zu der sie ja durch Lysolecithininjektionen aktiviert wurden, vollständig wahrzunehmen und wirkungsvoll nachzukommen, so daß die später übertragenen Tumorzellen anwachsen und die Tiere wie in der Kontrolle innerhalb 30 Tagen töten. Aus diesem Grunde wurde gezielt ein Versuch unternommen, der diese beiden Funktionen in ihrem gegenseitigen Einfluß zeigen soll:

6 Tage vor Übertragung von 1×10^4 EATZ wurden NMRI-Mäuse mit 2000 µg LL i.p. vorbehandelt. Durch diese Injektion werden ca. 30×10^6 PEZ induziert, von denen 60 - 80% vorwiegend aktivierte Makrophagen sind (55). Einen Tag vor Setzen des Tumors wurden ebenfalls i.p. verschiedene Konzentrationen von Schaferythrozyten injiziert. Am Tag 0 erfolgte die i.p. Überimpfung von 1×10^4 EATZ. Das Ergebnis dieses Versuchs nach 28 Tagen ist in Abb. 33 dargestellt.



^x KONTROLLE LL + EATZ : 100% OHNE TUMOR

Abb. 33: Veränderung der Tumorphylaxe LL-aktivierter PEZ durch Injektion verschiedener Schäfererythrozyten-Dosierungen.

In allen Kontrollgruppen, die die auf der Abszisse angegebene Zahl an Erythrozyten und anschließend 1×10^4 EATZ injiziert bekamen, wuchs der Tumor. Die Kontrollgruppe, die vor Tumordinokulation mit LL behandelt wurde, war wie bei allen anderen vorherigen Versuchen ohne jegliches Tumorstadium. Wurde jedoch diesen mit LL vorbehandelten Tieren kurz vor Transplantation des Tumors Erythrozyten i.p. gespritzt, so kam es mit steigender Erythrozytendosis zu einem immer stärker werdenden Tumorstadium in den einzelnen Gruppen. Bei der Dosis von $3,95 \times 10^8$ Erythrozyten/Tier

findet man 50% der Tiere mit Tumorwachstum. Erstaunlich ist, mit welcher Genauigkeit die einzelnen ermittelten Werte auf einer Geraden einer logarithmischen Funktion liegen, wobei der Korrelationskoeffizient 1 beträgt. Dies ist in der Tat ein starkes Indiz dafür, daß nach strenger Gesetzmäßigkeit eine Funktion des Makrophagen (extrazelluläre Vernichtung neoplastischer Zellen) von einer anderen (Phagozytose) je nach Dosierung eines Fremdanigens beeinträchtigt werden kann.

Das Ausschalten der Makrophagen, was zum einen durch die direkte Elimination mittels der Eisen/Magnet-Behandlung erreicht wurde und zum anderen durch die Behinderung oder Hemmung ihrer Effektorfunktion mittels phagozytierter Schaf-erythrozyten gelang, zeigt, daß damit auch die Antitumorwirkung der synthetischen Lysolecithin-Analoga aufgehoben wird und als Folge vermehrtes Tumorwachstum eintritt.

Diese Ergebnisse lassen es also sehr wahrscheinlich werden, daß Makrophagen eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung des antitumoralen Lysolecithin-Effektes spielen. Die Ergebnisse stehen mit denjenigen anderer Arbeitsgruppen, die in neuerer Zeit veröffentlicht wurden, in Einklang. Auch diese Untersuchungen haben gezeigt, daß in der Wechselwirkung zwischen Wirt und Tumor der Makrophage eine fundamentale Bedeutung als mögliche Effektorzelle einnimmt (104, 111, 112, 118-127).

Im Rahmen der zur Verfügung stehenden Zeit war es nicht möglich, die Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von synthetischen Lysolecithinen noch weiter auszubauen. Obwohl

starke Hinweise dafür erarbeitet werden konnten, daß der Makrophage und insbesondere der aktivierte Makrophage eine wichtige Überwachungsfunktion gegen das Entstehen und Ausbreiten malignen Wachstums hat, müssen drei zentrale Probleme künftigen Untersuchungen vorbehalten bleiben:

1. Wie wird der Makrophage aktiviert ?
2. Wie bzw. woran erkennt der aktivierte Makrophage die Tumorzelle ?
3. Wie tötet der aktivierte Makrophage die Tumorzelle ?

Es ist klar, daß dem in dieser Arbeit dargestellten Phänomen der verstärkten Tumorabwehr molekulare Mechanismen zugrunde liegen müssen. Diese zu untersuchen sollte möglich sein, da die LLA, die zur Aktivierung der Makrophagen und schließlich zum Tod der Tumorzellen führen, im Gegensatz zu vielen anderen Adjuvantien chemisch genau bekannt sind und ihr Stoffwechsel in der Abwehrzelle oder auch Tumorzelle daher zu verfolgen sein müßte.

IV. Diskussion

Der allergrößte Teil der Untersuchungen über den Wert einer Immuntherapie des Krebses sowohl beim Menschen wie auch beim Tier wurde mit Substanzen bzw. Bakterien unternommen, von denen seit langer Zeit bekannt ist, daß sie im klassischen Sinne als immunologische Adjuvantien, d.h. als Verstärkersubstanzen der humoralen Immunantwort dienen können. Hierzu zählen vor allen Dingen Mykobakterien (BCG) und deren Extrakte (MER), Corynebakterien, sowie Endotoxin und seine Derivate (44-48).

Die meisten organischen wie auch anorganischen Adjuvantien treffen nach Applikation im Organismus als erstes in der Regel auf Makrophagen, von denen sie gefressen werden. Nach Phagozytose dieser Substanzen kommt es je nach Konzentration des Adjuvans im Makrophagen zu einer Aktivierung der Phospholipase A und zur vermehrten Bildung von Lysolecithin und freien Fettsäuren (49-53,57,60,65). Dieser biochemische Befund wurde als kleinster gemeinsamer Nenner zur Erklärung des Wirkungsmechanismus von Adjuvantien benutzt. Es konnte tatsächlich gezeigt werden, daß die Antikörperbildung gegen verschiedene Antigene wie BGG, BSA oder Schaferthyrozyten durch die vorherige Injektion von Lysolecithinen erheblich gesteigert ist. Da Lysolecithin sehr schnell metabolisiert wird, wurde versucht, die adjuvante Wirkung durch synthetische und dadurch schwer metabolisierbare LLA zu verlängern. Tatsächlich zeigte sich, daß LLA eine größere adjuvante Wirkung auf die humorale Immunantwort haben als natürliches Lysolecithin (64). Offen war jedoch

die Frage, ob die Wirkung dieser Substanzklasse sich nur auf die humorale Seite einer immunologischen Antwort beschränkt oder ob auch die zellvermittelte Immunität gesteigert werden kann, wie dies von vielen bakteriellen Immunoadjuvantien in der Tumorimmunologie bekannt ist (44). Da man weiß, daß Abwehrmechanismen gegen Tumoren vornehmlich zellulärer Natur sind (14-17), wurde versucht, die Frage nach einer möglichen adjuvanten Wirkung der LLA auf zellulärer Ebene in verschiedenen Tumorsystemen der Maus (Ehrlich Ascites Karzinom, Myelom X5563, Myelom MPC-11) zu klären.

Der Einfluß synthetischer LLA auf das i.p. Wachstum des Ehrlich Ascites Tumors wurde zunächst durch deren intra-peritoneale Injektion untersucht. Um eine direkte cytotoxische Wirkung der i.p. gespritzten LL bzw. LLA auf den i.p. wachsenden Tumor auszuschließen, wurden die LL- bzw. LLA-Injektionen meistens 4 Tage vor Setzen des Tumors durchgeführt. Aus Untersuchungen mit radioaktiv markierten Analoga ist bekannt, daß 4 Tage nach deren i.p. Injektion davon nichts mehr im Bauchraum der Tiere vorhanden ist. Die Ergebnisse zeigen, daß mit diesen i.p. LL- bzw. LLA-Injektionen eine vom Antigen unabhängige, lang andauernde, selbst noch gegen hohe Tumorlasten wirksame Tumorprophylaxe erreicht wird. Sie ist noch 30 bzw. 60 Tage nach erfolgter Injektion in 90 - 100% der Fälle erhalten. Dieser langandauernde Tumorschutz kann nicht auf ein spezifisches immunologisches Gedächtnis gegenüber dem EAT zurückgeführt werden, da die Tiere nur mit LL vorbehandelt wurden. Durch diese LL-Injektion werden Makrophagen aktiviert, deren erhöhte Abwehrfunktion gegenüber Tumorzellen offenbar noch nach 60 Tagen erhalten ist. Dafür spricht auch die Tatsache, daß mononukleäre Phagozyten der Maus eine relativ lange Lebens-

dauer besitzen, die in der Größenordnung von Monaten liegen kann (128).

Wie die Untersuchungen mit steigender Tumorlast zeigen (Tab.3 und 4, S. 38 und 39) ist der prophylaktische Effekt erst bei einer Zellzahl von 5×10^6 EATZ nicht mehr vorhanden (Tab.3). Vor allem gegenüber sehr kleinen Tumoren wird ein maximaler protektiver Effekt erreicht (Tab. 4). Dieser Befund ist insofern bedeutsam, da bekannt ist, daß gerade mit sehr kleinen Tumorinokula ein Tumor besser angehen und progressiver wachsen kann als mit größeren ("sneaking through" (18)). Der i.p. Vorbehandlung folgt eine Resistenzverschiebung der Tiere gegenüber dem EAT von weniger als 100 Zellen (= LD_{50} -Wert von unbehandelten NMRI-Mäusen) bis mehr als 1 Million (= LD_{50} -Wert von Lysolecithinvorbehandelten NMRI-Mäusen, Tab. 1 und 3).

Dieser Effekt muß aufgrund der Ergebnisse über den Wirkungsmechanismus den Makrophagen zugeschrieben werden (siehe Abschnitt 4, S. 100). Dabei spielt offensichtlich nicht die absolute Zahl an Effektormakrophagen im Peritonealraum allein die entscheidende Rolle, sondern vielmehr der Funktionszustand dieser Zellen. Wenn die Tiere mit 250 - 500 μ g i.p. LL injiziert werden, verändert sich die Zahl der intraperitonealen Effektorzellen nicht signifikant (55) und trotzdem wird das Tumorstadium zu 100% verhindert (Tab. 4). Dieser Befund kann so gedeutet werden, daß bei i.p. Injektion dieser LL-Konzentrationen die dort befindlichen Makrophagen direkt aktiviert werden. In in vitro-Untersuchungen wurde die Cytotoxizität dieser aktivierten Zellpopulation gegenüber syngenischen Tumorzellen festgestellt (129). Daß hohe Konzentrationen von LLA (2000 μ g) zu einer mehrfachen Steigerung der Peritonealexsudatzellzahl durch Einwanderung von jungen aktivierten Makrophagen aus dem Knochenmark führt, ist ver-

ständig, da die Oberflächenaktivität dieser Substanz (100) einen entzündlichen Reiz auf das Peritoneum auslöst, wie es auch von anderen Irritantien bekannt ist. Durch diese Neueinwanderung immunkompetenter Zellen kann die intraperitoneale Zellzahl das 10-fache gegenüber dem unbehandelten Zustand erreichen (55).

Eine 5-fache Erhöhung der Peritonealexsudatzellzahl erreichten Ashley und Hardy (131) in Mäusen, denen 11 - 18 Tage zuvor 1×10^5 lebende, avirulente *Salmonella enteritidis* 11RX zur Immunisation intraperitoneal injiziert wurden. Die Autoren konnten zeigen, daß diese vermehrte Zellpopulation ebenfalls eine erhöhte antitumorale Aktivität gegenüber Ehrlich Ascites Tumorzellen in vivo als auch in vitro besitzt, die auch selbst noch 60 Tage später vorhanden ist, so daß ein intraperitoneal gesetzter Ehrlich Ascites Tumor in mehr als 50% der Fälle abgestoßen wird (90,131).

Eine erhöhte, unspezifische Tumorresistenz tritt auch nach Immunisation von Mäusen mit anderen Mikroorganismen auf. Diese Präimmunisationen wurden in der Hauptsache mit Mykobakterien (meist vom Stamm *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)) oder Corynebakterien durchgeführt.

Im Ehrlich Ascites Tumormodell konnten Chedid u. Mitarb. durch intraperitoneale Immunisation, die 14 Tage vor i.p. Injektion von 1×10^5 Tumorzellen mit BCG, *Mycobacterium smegmatis* und *Mycobacterium kansasii*-Zellwandpräparationen erfolgte, selbst noch nach 60 Tagen 70 - 90% Überlebende aufweisen (91).

Corynebacterium parvum (*C. parvum*) erwies sich jedoch in diesem System prophylaktisch weniger effektiv: Wie Halpern Biozzi, Stiffel und Mouton feststellten (132), zeigt die intraperitoneale Immunisation von Swiss-Mäusen, die zwei Tage vor der i.p. Injektion von 5×10^5 EATZ mit 250 µg *C. parvum* durchgeführt wurde, keinen signifikanten Unterschied zur nichtimmunisierten Kontrolle; die Mortalität lag bei ihr bei 96%, in der mit *C. parvum* vorbehandelten Gruppe bei 80%.

Aus den Untersuchungen von Castro (133), der ebenfalls Mäuse (C3H/He) mit *C. parvum* (2×1400 µg i.p.) vorbehandelte, resultierte nur eine größere Überlebenszeit dieser Tiere: Während die gesamte Kontrolle bereits bis zum 25. Tag nach der i.p. Inokulation von 1×10^5 EATZ gestorben ist, findet man in der mit *C. parvum* an den Tagen -2 und -1 vorbehandelten Gruppe alle Tiere noch lebend vor.

Es zeigte sich jedoch, daß der protektive Effekt von BCG als auch von *C. parvum* nicht nur in Abhängigkeit von Tumorstärke, Applikationsroute, Zeitpunkt der Immunisation und BCG/*C. parvum*-Dosierung steht, sondern daß vor allem die Herkunft und damit auch der Präparationsmodus der Vakzine eine ausschlaggebende Rolle spielt (21,92,134).

Zum Beispiel konnten Halpern u. Mitarb. (92) im gleichen Versuchsansatz wie oben erwähnt mit Swiss-Mäusen im EAT-System mit einer *C. parvum*-Vakzine des Institutes Mérieux (Tag -2: 500 µg *C. parvum*, Tag 0: 5×10^4 EATZ i.p.) nicht nur einen Aufschub im Auftreten der Mortalität erzielen, sondern konnten darüber hinaus die Höhe der Mortalität der behandelten Tiere bei etwa 25 % halten.

Watanabe berichtet, daß das i.p. Wachstum von 1×10^6 EATZ in Mäusen des ddD Stammes selbst durch dreimalige i.p. Vorbehandlung an den Tagen -9, -7, -5 mit E. coli Ultraschallpräparationen von jeweils 200 µg nicht verhindert werden kann. Erst die zusätzliche Nachbehandlung damit brachte komplette Inhibition des Tumorwachstums (135). Dagegen konnten Hager u. Mitarb. (93) durch Vorbehandlung von C57Bl/6J und C57L/J Mäusen mit der Westphal'schen Lipopolysaccharid-Präparation von E. coli O127B8 einen nahezu kompletten Schutz gegenüber 1×10^6 EATZ erzielen, indem sie diesen Tieren bis mindestens 10 Tage vor Setzen des Tumors mehrmals 50 µg dieses Endotoxinspräparates i.p. injizierten. Die Tiere waren gegen ein erneutes Inokulum von 1×10^6 Zellen resistent. In gleicher Weise konnten A/Jax und C3H/HeJ Mäuse vor dem Wachstum von 1×10^4 EATZ geschützt werden. Ferner zeigten die Autoren, daß mit einer Rohpräparation von "Coley's Mixed Bacterial Toxin" in C57Bl/6J Mäusen ein vollständiger und reproduzierbarer Schutz gegen EATZ eintrat, während ein gereinigtes Coley-Präparat ohne Wirkung blieb.

Vergleicht man die Wirkungen dieser bekannten Adjuvantien mit jenen, die in dieser Arbeit mit LL bzw. LLA erreicht wurden, so zeigt sich deutlich, daß LL bzw. LLA den gleichen oder einen oft erheblich größeren Schutz vor dem EAT vermitteln können.

Ein weiterer Vorteil der LLA gegenüber den bisher gebräuchlichen Adjuvantien ist darin zu sehen, daß sie als synthetische Derivate chemisch genau definiert sind; dadurch ist gewährleistet, daß sich Versuchsergebnisse, die mit diesen LLA erreicht wurden, immer exakt reproduzieren lassen. Darüber hinaus sind im Gegensatz zu vielen bakteriellen Adjuvantien, die oft sogar als Lebendvakzine angewandt

werden müssen, um überhaupt wirksam zu sein, keinerlei schädigende Nebenwirkungen während oder nach der LLA-Behandlung beobachtet worden.

Die Untersuchungen über den Einfluß des Tieralters auf die Tumorphylaxe durch i.p. Injektionen von ET-18-OCH₃ zeigen eine deutliche Altersabhängigkeit (Tab. 7 und 8). 100 Wochen alte NMRI-Weibchen, die mit verschiedenen ET-18-OCH₃-Dosierungen i.p. vorbehandelt wurden, waren nicht mehr imstande, einen 4 Tage später gesetzten Tumor abzustößen, wie dies mit 5 Wochen alten Tieren erzielt wurde. Im Gegensatz zu diesen war eine auffallend starke Vakuolisierung der Makrophagen dieser alten Tiere in PEZ-Ausstrichen zu beobachten (Abb.6, S. 46). Dies deutet daraufhin, daß eine im Alter begründete Beziehung zwischen dem Auftreten einer starken Vakuolisierung der Makrophagen und dem Abstoßungsvermögen dieser Zellen gegenüber einem Tumor bestehen könnte. Trifft diese altersassoziierte Inhibition der für die Abwehr zuständigen Makrophagen zu, dann kann darin vielleicht auch eine der vielen Möglichkeiten gesehen werden, die es einem Tumor gestatten, sich der Makrophagen-Kontrolle des Wirts zu entziehen (136, 137). Dies ist jedoch rein hypothetisch, da über die Natur bzw. Ursache dieser Vakuolisierung noch Unklarheit herrscht. Wie im Abschnitt 4 (S.100) zum Wirkungsmechanismus der LLA dargestellt wird, gelingt es experimentell eine Cytotoxizitäts-Hemmung aktivierter Makrophagen aus 4 - 5 Wochen alten Tieren durch Inkubation mit Schaferythrozyten zu provozieren, so daß ein gleichzeitig transplantierte Tumor ungehindert angehen kann.

Diese experimentellen Befunde werden durch eine 1976 erschienene Arbeit von Weinberg und Hibbs (117) bestätigt. Beide Autoren konnten eine Hemmung der antitumoralen Makrophagenaktivität nicht nur durch Phagozytose von Erythrozyten,

sondern auch durch die Phagozytose von *Candida albicans* nachweisen. Ebenfalls stellten sie eine Korrelation zwischen Erythrozytenzahl und Tumorstadiumsfeststellung fest. Bei einem Verhältnis von 25 : 1 = SRBC : PEZ war die Abtötungskapazität zwischen 0 und 10%, während die Kontrolle 90 - 100% zeigte. Auch konnten sie den Nachweis erbringen, daß die Phagozytose von Erythrozyten bzw. *Candida albicans* eine Voraussetzung für die Hemmung der Abtötungsfunktion darstellt. Diese kann deshalb nicht auf die hohe Erythrozyten-dichte zurückgeführt werden.

Wheatley zeigte bereits 1964 und 1966, daß die i.p.-Injektion von Kieselgur wenige Stunden vor der i.p. Injektion von 10×10^6 EATZ ein schnelleres Tumorstadiumsfeststellung als in den Kontrollmäusen nach sich zieht (138). Hardy und Kotlarski folgern daraus, daß durch diese Kieselgurinjektionen das Reticuloendotheliale System überladen wird, so daß nur noch sehr wenige Phagozyten zur Verfügung stehen, um das Tumorstadiumsfeststellung zu verhindern (90). Auch ist bekannt, daß eine altersbedingte Suppression oder Blockade des RES durch Vitalfärbung oder Kolloide zu erfolgreichen Transplantationen sowie auch zu beschleunigtem Tumorstadiumsfeststellung führt (139).

Die therapeutische Wirkung von LLA wurde in allen drei Tumorsystemen untersucht.

Im Vergleich zur prophylaktischen Behandlung, durch die immer ein 90 - 100%iger Schutz gegen einen mehrere Tage oder Wochen später implantierten Tumor gewährleistet ist, kann bei der Behandlung von bereits etablierten Tumoren verständlicherweise diese hohe Erfolgszahl nicht erwartet werden. Der prophylaktische Erfolg beruht darauf, daß im Bauchraum aktivierte Zellen bereits bis zum Zeitpunkt der Tumorstadiumsfeststellung vorhanden und neu eingewandert sind, da der Tumor in den meisten Fällen

erst 4 Tage später injiziert wird. Bei der parenteralen oder oralen therapeutischen Applikation ist die Situation für den Organismus sicherlich viel ungünstiger. Der Tumor wächst bereits zu einem Zeitpunkt, zu dem vermutlich erst im Organismus Zellen aktiviert werden, die den Tumor zerstören können. Es kommt somit zu einem Wettlauf zwischen Tumorstadium auf der einen Seite und Zellaktivierung sowie Einwanderungsgeschwindigkeit auf der anderen Seite. Auch ist dem Intervall zwischen Tumordinjektion und Zeitpunkt des Therapiebeginns durch das Wachstum des Tumors Grenzen gesetzt. Die Tumormasse weist sich als limitierender Parameter für eine erfolgreiche Therapie aus. Die Bedeutsamkeit von Untersuchungen und vor allem von Erfolgen auf dem Gebiet der therapeutischen Anwendung liegt in der Analogie zur menschlichen Tumorsituation. Sie sind daher von größtem klinischem Interesse.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen trotzdem, daß im Tierexperiment gegen experimentell gesetzte Tumoren der Maus mit LLA erfolgreich therapiert werden kann. Dies kann mit verschiedenen Therapieschemata dieser drei Tumormodelle aufgezeigt werden:

- EAT : LD_{50} -Anstieg von 1×10^2 bis 1×10^5 Zellen (i.p.)
durch 100 μ g ET-18-OCH₃ (14 x i.v.)
- X5563: LD_{50} -Anstieg von 2×10^4 bis $> 2 \times 10^5$ Zellen (s.c.)
durch 50 μ g ET-18-OCH₃ (20 x oral)
- MPC-11: LD_{50} -Anstieg von 5×10^3 bis 2×10^4 Zellen (i.c.)
durch 1 μ g ET-18-OCH₃ (21 x s.c.)

Diese Aufstellung zeigt bereits deutlich, daß jeder dieser drei Tumoren ein eigenes Therapieschema besitzt.

In Übereinstimmung mit den Resultaten der Untersuchungen über die adjuvante Wirksamkeit auf die humorale Immunantwort dieser LLA (55,56) konnte demonstriert werden, daß zur adjuvanten zellvermittelten Antitumorwirkung dieser LLA ebenfalls eine bestimmte Molekülstruktur vorliegen muß. Dies ist nicht nur bei prophylaktischer Anwendung, wie es in anfänglichen Versuchen von Langer (56) und später von Tarnowski (95) demonstriert werden konnte, der Fall, sondern dieser Befund erstreckt sich auch auf die parenterale und orale therapeutische Anwendung dieser LLA.

Es zeigt sich, daß neben der Kettenlänge der Fettsäure am C-1-Atom auch die Art der Bindung - ob Ester- oder Ätherbindung - der Fettsäure an das Glyceringerüst von entscheidender Bedeutung für die Wirkung auf das Tumorstadium ist. Beide Eigenschaften - eine langkettige Fettsäure am C-1-Atom zum einen als auch deren Verknüpfung am Glyceringerüst durch eine Ätherbindung zum anderen, sind in den LLA ET-18-OH und ET-18-OCH₃ vorhanden.

Die orale Wirksamkeit ruft deshalb Erstaunen hervor, da bekannt ist, daß ätherspaltende Enzyme im Dünndarm vorhanden sind (130). Vielleicht ist aber die Substitution am Kohlenstoffatom 2 des Moleküls und die Tatsache, daß dieses Lysolecithinmolekül eine DL-Verbindung ist, verantwortlich dafür, daß es möglicherweise unabgebaut in den Organismus resorbiert werden kann. Aus neueren Untersuchungen der Arbeitsgruppe ist bekannt, daß insbesondere Äther-Lysolecithine mononukleäre Zellen *in vitro* aktivieren können. Da der Darmtrakt neben Haut und Lunge eine äußerst große Barriere zur Außenwelt darstellt, ist es denkbar, daß das aufgenommene ET-18-OCH₃ im Bindegewebe unterhalb der Mukosa auf eine breit Front von Abwehrzellen, insbesondere von Makrophagen trifft und diese aktiviert. Diese

Überlegungen sind jedoch sehr hypothetisch und bedürfen exakter quantitativer Untersuchungen am Magen-Darm-Trakt in vivo. Untersuchungen von Arnold u. Mitarb. (96) über die Verteilung und den Metabolismus von oral verabreichtem Äther-Lysolecithin im Mäuseorganismus (NMRI-Weibchen) bestätigen die Annahme einer kompletten Resorption der LLA. Dem oral applizierten synthetischen Äther-Lysolecithin konnte ein starker Depoteffekt zugeschrieben werden, da es im Gastrointestinal-Trakt noch nach Stunden nachweisbar ist und sich langsam und gleichmäßig im Organismus verteilt (96).

Die kausalen Zusammenhänge dieser unterschiedlichen Affinitäten der verschiedenen LLA zu den jeweiligen Tumoren sind jedoch noch unbekannt.

Wie zuvor erwähnt, sind neben anderen Basisparametern der Zeitpunkt des Therapiebeginns und die Zellzahl des Inokulums für den Ausgang einer Tumorthherapie von entscheidendem Einfluß. Als Beispiel seien die Verhältnisse in Experimenten erwähnt, bei denen mit der therapeutischen Behandlung der Tiere erst eine Woche nach Setzen des Tumors begonnen wurde.

Am Tag 0 wurden NMRI-Mäuse mit 1×10^4 EATZ i.p. injiziert. Wie aus Abb. 34 hervorgeht, ist die intraperitoneale Zellzahl zu Therapiebeginn bis $3 - 5 \times 10^6$ EATZ/Maus angewachsen. Zu diesem Zeitpunkt ist der Tumor bei einigen Tieren bereits äußerlich sichtbar. Trotz dieser hohen Tumorlast und späten Therapiebeginns erweist sich die Therapie dieser Tiere mit ET-18-OCH₃ als äußerst wirksam. Durch die ET-18-OCH₃-Therapie ist offenbar eine angelaufene körpereigene Antwort der Tiere gegen den aufkommenden Tumor verstärkt worden, so daß, wie es die Versuche von S.62 darlegen, 60 - 80% dieser Tiere überleben. Diese Interpretation lässt sich auch auf die im MPC-11-Tumormodell beobachteten Totalregressionen nach bzw. während der LLA-Therapie anwenden (s.S. 87).

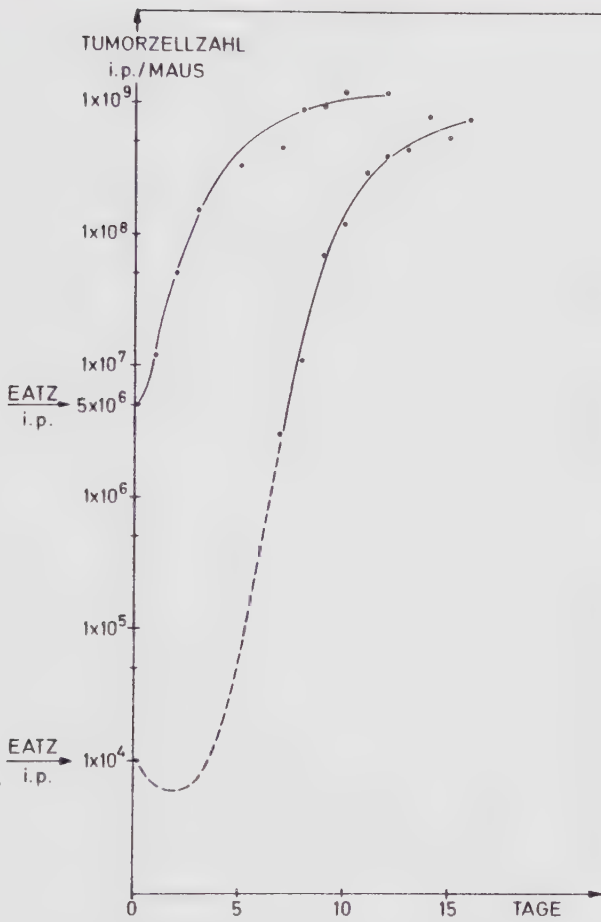


Abb. 34: Intraperitoneales Wachstum des EAT in NMRI-Mäusen (φ)

----- = angenommene Zellzahl

Durch das Wachstum des Tumors wird die Antigenität quantitativ erhöht, die anscheinend ausreichend ist, um eine Immunantwort des Wirts gegen den Tumor auszulösen. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse von Immunisierungsversuchen gestützt, die zeigen, daß bereits schon mit 1×10^6 bestrahlter EATZ NMRI-Mäuse effektiv immunisiert werden können. Daß durch diese ET-18- OCH_3 -Injektionen ein bereits angelaufener körpereigener Abwehrmechanismus in seiner Wirksamkeit verstärkt wird, zeigt sich bereits in der Tatsache, daß diese hohe Tumorlast von $3 - 5 \times 10^4$ EATZ, wenn sie am Tag 0 in unbehandelte NMRI-Mäuse i.p. injiziert wird, selbst mit einer am nächsten Tag einsetzenden i.v. ET-18- OCH_3 -Behandlung in ihrem Wachstum nicht mehr aufzuhalten ist. Dieses Inokulum erreicht innerhalb von 2 Tagen das 10-fache seiner ursprünglichen Zellzahl und hat, wie in Abb. 34 zu sehen ist, innerhalb einer Woche sein maximales Ausmaß von ca. 1×10^9 Zellen / Maus erreicht. Wie die Versuche mit steigender Tumorlast und i.v. ET-18- OCH_3 -Therapie ab Tag +1 zeigen, ist jedoch bei einem Inokulum von 5×10^5 EATZ kein therapeutischer Effekt mehr nachweisbar. Geht man von der Annahme aus, daß das ab Tag +7 i.v. verabreichte ET-18- OCH_3 direkt cytotoxisch auf den wachsenden Tumor wirken und dadurch die kurativen Effekte erklärbar machen würde, so müßte man andererseits auch erwarten, daß durch das ab Tag +1 i.v. gespritzte ET-18- OCH_3 ein Tumor gleicher Größe ($3 - 5 \times 10^6$ EATZ i.p.), der am Tag 0 inokuliert wurde, vernichtet wird. Dies ist jedoch, wie oben aufgeführt, nicht der Fall. In vitro-Untersuchungen belegen, daß LLA-Mengen in der Konzentration von $1 \mu\text{g}$ für Tumorzellen nicht toxisch sind (Munder pers. Mitt.). Wie die Versuchsergebnisse zeigen, kann jedoch mit $1 \mu\text{g}$ ET-18- OCH_3 erfolgreich therapiert werden. Auch der auf S. 73 dargelegte Versuch über direkte, tägliche intratumorale Injektionen von ET-18- OCH_3 als auch die Tatsache, daß kein lineares Dosiswirkungs-

verhältnis besteht, beweisen, daß die therapeutischen Erfolge nicht auf einer direkten cytotoxischen Wirkung von ET-18-OCH₃ auf den wachsenden Tumor beruhen können. Vielmehr erscheint es als zutreffend, daß der Wirt, wie es F.M. Burnet formuliert, "-..seems to have some resistance of its own against some developed cancers" (140), und daß diese natürliche Resistenz durch LLA-Applikation in Gang gesetzt und verstärkt wird, so daß der Wirt in der Lage ist, selbst supraletale Tumormengen erfolgreich abzustößen und eine Immunität aufzubauen. Die Beobachtung, daß remittierende Tumoren nach Therapieende sich noch weiter zurückbilden und völlig verschwinden, zeigt, daß durch die LLA-Therapie Abwehrmechanismen in Gang gesetzt werden, die dann noch tätig sind, wenn man die LLA-Injektionen bereits seit mehreren Tagen abgesetzt hat.

Neben der Arbeit von Burnet sind auch eine Reihe anderer Arbeiten erschienen, in denen darauf aufmerksam gemacht wird, daß sich ein tumortragender Organismus gegen einen aufkommen- den Tumor immunologisch zur Wehr setzen kann (14-17,82,83). Auch konnten mehrere Autoren eine gesteigerte Phagozytose- rate des RES in Tieren mit Ehrlich Ascites Tumor feststellen (141,142). Ob dies jedoch als Hinweis auf eine gesteigerte natürliche Tumoresistenz zu werten ist, bleibt unklar, da eine gesteigerte Phagozytosefunktion nicht unbedingt mit einem Anstieg der Tumorabwehr korrelieren muß (143) (s. Phagozytose- experiment S. 115).

Wie die vorliegende Arbeit zeigt, führt die mit LLA durch- geführte Therapie, mit der 1 - 9 Tage nach Setzen der Tumoren begonnen wurde, in allen drei vorgestellten Tumormodellen zu kurativen Effekten zwischen 50 und 80%.

Aus der Literatur ist bekannt, daß bei therapeutischer Anwendung anderer Adjuvantien, wie z.B. BCG, C. parvum, Endotoxin usw., die Antitumorwirkung geringer ist, als bei prophylaktischer Anwendung. In verschiedenen Tumor- und Mäusestämmen konnte entweder eine Verlängerung der Überlebenszeit, verzögertes Angehen der Tumoren, retardiertes Tumorwachstum, vorübergehende Regression oder auch Totalregression der Tumoren erzielt werden (44,45). Es konnte gezeigt werden, daß durch die Injektion von Endotoxin in Mäusen ein Faktor im Serum induziert wird, der solid wachsende Tumoren zur Regression bringen kann (46-48). So gelingt es mit 10 - 100 µg Endotoxin (i.v./i.p.) Tumornekrosen bei bereits 10 mm im Durchmesser großen, Methylcholanthren-induzierten Sarkomen der Maus hervorzurufen, so daß der Tumor total regrediert. Der Wirkungsmechanismus ist noch nicht hinreichend geklärt; er ist jedoch wahrscheinlich nicht immunologischer Natur, sondern beruht offenbar auf einem intratumoralen Shwartzman-Phänomen (Munder, pers. Mitt.).

Nach diesen Ausführungen stellt sich die Frage: Wie erklärt sich der antitumorale Erfolg der Lysolecithin-Analoga ?

Bereits zu Beginn der Untersuchungen zog die mit LL bzw. LLA Injektionen induzierte Peritonealzellpopulation besonderes Interesse auf sich, da mit ihr im adoptiven Transfer die antitumorale Aktivität in normale Empfängertiere übertragen werden kann (Tab. 22, S.116). Die Möglichkeit der Übertragung von Tumorresistenz mittels dieser Zellpopulationen wurde bereits 1963 von Old, Boyse, Bennett und Lilly aufgezeigt (144). Auch Ashley und Hardy konnten Tumorresistenz mit dieser intraperitonealen Zellpopulation, die durch die vorherige Injektion von *Salmonella enteritidis* 11RX induziert wurde, in normale Mäuse übertragen und die Cytotoxizität dieser Population gegen Ehrlich Ascites Tumorzellen in vivo und in vitro nachweisen (131). Ebenfalls mit Peritonealzellen konnten Hager u. Mitarb. (93) im passiven Transfer die durch Endotoxin erreichte EAT-Prophylaxe vermitteln; isogene Milzzellen oder Serum von Endotoxin-Mäusen waren ineffektiv.

Da Peritonealexsudatzellen eine heterogene Population verschiedener Zelltypen darstellen, waren Analysen zur Ermittlung der für die Antitumorwirkung verantwortliche Zellgruppe notwendig. Ganzkörperbestrahlung oder Cyclophosphamid-Behandlung brachten keine Änderung des Effektes mit sich; die behandelten Tiere waren noch in der Lage, den Tumor vollständig abzustoßen. Erst nach Ausschaltung der Phagozyten, insbesondere der Makrophagen durch a) Absättigung mit Schaferythrozyten und b) mittels der Eisen/Magnet-Behandlung kam es zum Tumorwachstum, so daß die Tiere innerhalb von 25 - 30 Tagen starben. Wurden die Makrophagen unbehandelt in der Suspension belassen, starb keines der Tiere.

In diesem Zusammenhang sei auf die Versuche von Keller verwiesen (104,145). Er konnte demonstrieren, daß aktivierte Makrophagen durch Röntgenbestrahlung mit 5000 R in ihrer antitumoralen Kapazität nicht beeinträchtigt werden. Erst die Behandlung mit Silika oder anderen, selektiv für den Makrophagen toxischen Substanzen hob die antitumorale Makrophagenwirkung auf, was in vermehrtem Tumorwachstum resultierte.

Diese Versuche zum LLA-Wirkungsmechanismus unterstreichen die Notwendigkeit der Präsenz von Makrophagen im Abwehrgeschehen gegen Tumor. Die Notwendigkeit von Makrophagen in der Ausbildung einer durch LLA verstärkten humoralen Immunantwort gegenüber partikulären Antigenen wurde bereits an anderer Stelle gezeigt (Raetz, unveröffentl. Ergebnisse). Offen bleibt jedoch vorläufig die Frage, ob lösliche Lymphocytenprodukte (125) in der durch LLA-induzierten Makrophagen-Cytotoxizität eine Rolle spielen (z.B. zur Kooperation, Aktivierung, Erkennung), da neben radioresistenten Lymphocyten auch die Produktion solcher Faktoren nicht ausgeschlossen ist.

Gorer hatte als erster in seiner Arbeit aus dem Jahre 1956 darauf hingewiesen, daß Makrophagen an der Abstoßung insbesondere von Ascitestumoren beteiligt sind (14). Dies konnte in den folgenden Jahren von verschiedenen Autoren (148-149) ebenfalls bestätigt werden. Hauptsächlich seit den letzten fünf bis zehn Jahren gewinnt der Makrophage in der tumorimmunologischen Literatur wieder zunehmend an Bedeutung, nachdem für ihn zwischenzeitlich "das immunologische Interesse kaum größer war als an Fibroblasten oder schuppigen Epithelialzellen" (150), (99,124,147).

Ausgehend von der klassischen Arbeit von Mackaness (151), in der gezeigt wurde, daß sich die gesteigerte Makrophagenaktivität in Tieren, die mit *Listeria monocytogenes* infiziert wurden, nicht nur auf diese Mikroorganismen allein beschränkt, sondern unspezifisch auch andere, in der Antigenität verschiedene, phylogenetisch nicht verwandte Keime betrifft, konnten mehrere Arbeitsgruppen den Nachweis führen, daß sich dieses heterologe Resistenzphänomen (cross protection) auch auf die Resistenz gegenüber experimentellen Tumoren erstreckt (118-120,127,152). Es gilt heute als gesichert, daß die Resistenz, die gegenüber transplantierten Tumoren durch Infektion von Mäusen mit verschiedenen Mikroorganismen (119,127,152) oder durch Applikation anderer Immunpotentiatoren (118,120) induziert werden kann, auf der erhöhten cytotoxischen Aktivität von Makrophagen beruht. Die bisherigen Ergebnisse der Tumorversuche mit LLA weisen ebenfalls in diese Richtung. Wahrscheinlich können dabei zwei Effekte unterschieden werden: Hohe Gaben von natürlichem LL als auch LLA führen bei i.p. Injektion zur Einwanderung von jungen und "unverbrauchten" Makrophagen aus dem Knochenmark, die offenbar sehr viel besser in der Lage sind, Tumorzellen abzutöten als die normalerweise im Bauchraum vorhandenen Makrophagen (153). In diesem Zusammenhang konnte immer wieder beobachtet werden, daß zwar sicher die Erhöhung der Peritonealzellzahl auch wichtig ist für den Schutz gegenüber dem Ehrlich Ascites Tumor z.B., bei niederen Dosierungen von LLA aber zeigen sich keine quantitativen Unterschiede gegenüber einem unbehandelten Tier und der Tumor wird ebenfalls abgestoßen. Demzufolge muß sich die Qualität der intraperitoneal vorhandenen Zellen geändert haben. Der zweite Effekt besteht deshalb wahrscheinlich in einer direkten Aktivierung von Makrophagen.

Aktivierte Makrophagen zeichnen sich durch eine Reihe von Veränderungen aus, wobei darunter im Zusammenhang mit Tumor vor allem eine erhöhte Cytotoxizität gegenüber neoplastischen Zellen verstanden wird.

Worauf jedoch das erhöhte Cytotoxizitätsvermögen per se beruht, ist noch ungeklärt, doch erscheint es denkbar, daß eine bessere Erkennung der Malignität durch den Makrophagen diesem erhöhten Funktionszustand zugrunde liegen kann. Dies wird vor allem dadurch gestützt, daß Tumorzellen nicht als "innocent bystander", sondern selektiv von Makrophagen abgetötet werden können (119). Diese Cytotoxizität erstreckt sich auf syngene, allogene oder ~~xenogene~~ Tumor-Zellen, wohingegen normale, d.h. nicht neoplastisch veränderte Zellen, die auch allogener Herkunft sein können, nicht attackiert werden (119,126,154). Meltzer konnte dies mit allogenen, sich ebenfalls schnell teilenden Fibroblasten in vitro nachweisen (119).

Als gesichert kann bisher in diesem Zusammenhang angesehen werden, daß zur Ausbildung der Cytotoxizität enger Zell-zu-Zell-Kontakt zwischen Effektor- und Zielzelle vorliegen muß. Im Gegensatz zur Phagozytose von noch lebenden Tumorzellen durch Makrophagen, wie dies von verschiedenen Autoren (155, 156) beschrieben wurde, kann die Abtötung der Tumorzelle auch außerhalb des Makrophagen erfolgen (sogen. extrazelluläres Killing); erst nachträglich konnte gelegentlich die Phagozytose der Zelltrümmer beobachtet werden. Die näheren Umstände jedoch, die zum "lethal hit" führen, sind bisher noch Gegenstand umfangreicher Spekulationen geblieben. Unsere in vitro- und in vivo - Versuche zeigen, daß eine Aktivierung von Makrophagen nur durch Alkyl-Lysophospholipide ausgelöst wird (52), da natürliches Lysolecithin oder andere Esterverbindungen schnell durch normale Zellen wie Makrophagen

metabolisiert werden können (60). Durch die kontinuierliche Adsorption der applizierten Alkyl-Lysophospholipide werden bestimmte Oxygenasen der Makrophagen aktiviert, die diese an sich ungewöhnlichen Alkyl-Lysophospholipide spalten (157-159). Neoplastisch transformierte Zellen zeichnen sich durch einen relativ hohen Gehalt an Ätherlipiden aus (160), da sie die Fähigkeit der Ätherspaltung offenbar nicht mehr besitzen (161). Das hat zur Folge, daß diese Substanzen nicht wie natürliches Lysolecithin oder andere Acylverbindungen metabolisiert werden können, sondern sich in der Tumorzellmembran unvermeidbar akkumulieren, wodurch die Tumorzelle gegenüber dem Angriff eines Makrophagen sensibler wird. Man kann sich vorstellen, daß aktivierte Makrophagenoxygenasen die akkumulierten Ätherlipide der Tumorzelle spalten, sobald der Makrophage in engem Zell-zu-Zell-Kontakt mit der Tumorzelle steht. Die Tumorzelle kann aufgrund der eingetretenen Membrandestabilisierung ihre innere Milieukonstanz nicht mehr aufrecht erhalten und lysiert. Hinzu kommt, daß diese Analoga kompetitiv Membranenzyme hemmen können, die für den Umsatz des natürlichen Lysolecithins verantwortlich sind, denn natürliches Lysolecithin wird kontinuierlich in physiologischer Weise von der Plasmamembran adsorbiert und dient nach Acylierung zur fortlaufenden Erneuerung des Lecithins in der Lipidschicht der Zellmembran (162).

Der primär nicht phagocytäre, jedoch vom Zell-zu-Zell-Kontakt abhängige Mechanismus der Zielzellzerstörung durch Makrophagen beinhaltet nach der Auffassung von Hibbs einen direkten Transfer lysosomaler Makrophagen-Enzyme in die Tumorzelle (152).

Diese Exocytose von Lysosomen aktivierter Makrophagen erfordert Membranfusion, die, so spekuliert Hibbs (122), durch die erhöhte Membranfluidität der aktivierten Makrophagen

(als äußeres Zeichen des Aktiviertseins) einerseits und der Tumorzelle (als fundamentaler Ausdruck des neoplastischen Phänotyps) andererseits begünstigt wird; denn normale, d.h. nicht aktivierte Makrophagen weisen eine im Vergleich zu Membranen aktivierter Makrophagen relativ stabile Membran auf, die sie daran hindert, mit Tumorzellen zu fusionieren. Dies trifft jedoch auch für aktivierte Makrophagen zu, die mit normalen Zellen nicht in Fusion treten können, da diese im allgemeinen keine erhöhte Fluidität ihrer Membran besitzen.

Von Lysolecithin ist bekannt, daß es Membranfusionen erleichtert bzw. induziert (163). Falls die Tumorzelle tatsächlich nicht imstande sein sollte, adsorbierte synthetische Äther-Lysolecithine zu spalten und es dadurch zur Akkumulation in ihrer Membran kommt, dann ist es denkbar, daß diese Dysfunktion möglicherweise eine Beschleunigung der Membranfusionen, wie sie von Hibbs erörtert wurden, bewirkt und damit den Lysevorgang vorantreibt.

Neben dieser möglichen Beschleunigung der Membranfusion ist es ebenfalls denkbar, daß antigenerkennende Signale modifiziert oder schwache bzw. verborgene membranständige Antigene der Tumorzelle (sogen. Kryptantigene) besser exponiert werden und dadurch, wie dies schon mehrfach erwähnt wurde, einen verstärkten antigenen Reiz abgeben, wobei man von der Vorstellung auszugehen hat, daß die akkumulierten LLA-Moleküle möglicherweise keilförmig in die Phospholipoidschicht der Tumorzelle eingelagert sind, da ihnen am C-2-Atom des Glyceringerüsts eine langkettige Fettsäure fehlt, wodurch der hydrophobe Anteil geringer ist und die Membran gewissermaßen vermehrt verflüssigt wird (55,56).

Evans und Alexander sehen im Vergleich zur Phagozytose (als intrazellulärer Abtötungsmechanismus) in diesem von Hibbs vorgeschlagenen Lysosomentransfer während des extrazellulären Abtötungsvorgangs grundsätzlich keine Verschiedenheiten der für diese beiden Vorgänge notwendigen Basis-komponenten, denn die Evolution zur extrazellulären Zielzellzerstörung brachte nach ihrer Ansicht lediglich eine Umstellung der Reihenfolge bzw. Abfolge dieser Komponenten während des cytotoxischen Prozesses mit sich (123).

Diese Befunde zeigen, daß die Aufklärung des Mechanismus dieser selektiven Makrophagencytotoxizität gegenüber neoplastisch Entartetem vom zentralem tumorimmunologischen Interesse ist. Nach wie vor ungeklärt sind die Vorgänge, die der Phagozytose bzw. dem extrazellulären Abtöten unmittelbar vorangehen und den ersten Erkennungsschritt darstellen.

Zwar konnte mehrfach die Beteiligung cytophiler Antikörper nachgewiesen werden, doch ist darin keine grundsätzliche Erklärung dieses Phänomens zu sehen, da Antikörper und die durch sie vermittelte Cytotoxizität phylogenetisch später auftreten (164,165), d.h. zu einem Zeitpunkt, zu dem bereits zuvor reine zelluläre Abwehrmechanismen in präkambrischen Formen (Protozoen als auch niedere Metazoen) wirkungsvoll operiert haben müssen, wobei generell dem nativen Prozeß der Phagozytose ein - wenn auch grobes - Erkennungsvermögen von Fremd zugesprochen wird ("... some intrinsic capacity to discriminate" (166), (165). Durch das Vorhandensein cytophiler Antikörper wird sicherlich die Erkennungsmöglichkeit verbessert (Makrophagen besitzen Fc-Rezeptoren), so daß die Phagozytose schneller und in vermehrtem Maße abläuft. Dies gilt auch für Serumfaktoren und andere Opsonine mit pseudoimmunologischen Eigenschaften höherer Invertebraten (166,167).

Die antitumorale wie bakterielle Resistenz finden ihren Ausdruck in einem gemeinsamen Abwehrmechanismus, der durch die Funktion der Makrophagen repräsentiert wird. Das auf S. 111 aufgeführte Nu/Nu-Experiment macht deutlich, daß den Makrophagen eine entscheidende Rolle in der Abwehr von Tumoren zukommt. Diese Tiere zeigen einen Defekt in thymus-abhängigen Immunreaktionen und es fehlt die humorale Antwort gegenüber einer Reihe von Antigenen. Trotzdem sind sie, wie im Vorangegangenen gezeigt wurde, imstande, experimentell gesetzte Tumoren abzustoßen. Auch ist von der Literatur her bekannt, daß in diesen Tieren äußerst selten Spontantumoren auftreten (168). Ebenfalls ist bekannt, daß ihr Überleben als thymusdefekte und somit immunologisch nicht intakte Tiere außerhalb der keimfreien Aufzuchtstätten durch die Funktion der Makrophagen für Monate garantiert wird. Daß der Makrophage derartigen Aufgaben gewachsen ist, zeigt sich bereits bei Invertebraten, in denen der Makrophage (i.w.S.) noch in Abwesenheit von Lymphozyten, Plasmazellen und Immunglobulinen als primordialer Verteidigungsmechanismus eingesetzt ist. Betrachtet man die Evolution dieses Schutzmechanismus, so stellt man fest, daß das Prinzip der Phagozytose eines der phylogenetisch ältesten und einfachsten, doch äußerst wirksamen Abwehrmechanismen darstellt (165,169). Es ist vielseitig eingesetzt (Ernährung, Abräumen von Zelldetritus, z.B. auch in der Ontogenie, Verteidigung) und in den verschiedenen Stämmen anzutreffen (169-171).

Trotz des hohen Komplexitätsgrades des immunologischen Abwehrsystems der Vertebraten und vor allem der Säuger ist das Bollwerk des Körpers (neben der Haut) gegen pathogene Mikroorganismen weitgehendst von phagozytären Mechanismen abhängig.

Vollkommene Abwesenheit von B- und T-Lymphozyten oder ein Defekt im Komplementsystem ist nicht so unmittelbar lebensbedrohend wie die vollständige Abwesenheit der phagozytären Funktion (172).

Wohl kaum treffender zu charakterisieren ist die heutige Ansicht über die Stellung des Makrophagen im Tumoralabwehrgeschehen, wie sie Nelson formuliert: "Going into more fundamental biological principles, one may well ask whether the anti-tumor effect of activated macrophages reflects the existence of a primitive surveillance mechanism whose presence might be sought in nonmammalian or even invertebrate species " (150).

In der ersten Linie der Abwehr stellt die Gruppe des Makrophagen eine primäre, antigen-unspezifisch operierende, andauernde Barriere der Tumoralüberwachung dar, an die sich ein höherer Organismus noch spezifische immunologische Mechanismen anschließen können (124,152,173). Auch diese vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß dem Makrophagen in der Tumoralabwehr eine fundamentale Bedeutung als Effektorzelle zuzuschreiben ist, in dem er Überwachungsfunktionen im Organismus gegenüber maligne entarteten Zellen ausübt, ohne daß notwendigerweise der gesamte immunologische Apparat daran beteiligt ist. Wohl kann ein Makrophage, der eine oder mehrere Tumorzellen abgetötet hat, durch die Aufarbeitung des phagozytierten Antigens eine immunologische Folgereaktion auslösen, jedoch ist es offenbar nicht notwendig, daß an diesem ersten Schritt immer das Immunsystem beteiligt ist. Im Gegenteil, es ist seit Jahren immer wieder darauf hingewiesen worden, daß eine immunologische Reaktion im Verlauf des Tumoralwachstums nicht nur nützlich, sondern sogar schädlich sein kann (174,175).

Hauptsächlich diese Ambivalenz, mit der die körpereigene Abwehr gegen auftauchende Tumoren wirksam werden kann, hat in den letzten Jahren zu einer gewissen Ernüchterung über die Rolle des Immunsystems bei der Abwehr von Tumoren geführt.

Es sollte deshalb versucht werden, gezielt die Überwachungsfunktion der Makrophagen gegenüber neoplastischen Zellen zu aktivieren. Vielleicht spielen, neben anderen, die hier vorgestellten Substanzen in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle.

V. Literaturverzeichnis

1. Héricourt, J., and Richet, Ch.
De la sérothérapie dans le traitement du cancer.
C.r.hebd.séances acad.sci. 121: 567 (1895)
2. Von Leyden, E., and Blumenthal, F.
Vorläufige Mitteilung über einige Ergebnisse der
Krebsforschung aus der 1. Medizinischen Klinik.
Dtsch.med.Wschr. 28: 637 (1902)
3. Jensen, C.O.
Experimentelle Untersuchungen über Krebs bei Mäusen.
Zentralbl.f.Bakteriol. 1.Abt., Jena 34: 28 (1903)
4. Clowes, G.H.A.
Preliminary communication regarding an immune body
capable of inhibiting the development of cancer in
mice (Adeno-Carcinoma, Jensen).
Johns Hopkins Hospital Bull. 16: 130 (1905)
5. Clowes, G.H.A., and Baeslack, F.W.
Further evidence of immunity against cancer in mice
after spontaneous recovery.
Med. News 87: 968 (1905)
6. Gaylord, H.R., Clowes, G.H.A., and Baeslack, F.W.
Preliminary report on the presence of an immune body
in the blood of mice spontaneously recovered from
cancer (Adeno-Carcinoma Jensen) and the effect of this
immune serum upon growing tumors in mice affected with
the same material.
In: Contributions to the subject of immunity in cancer
from the Annual reports of the New York State Cancer
Laboratory, p. 58, Lyon Comp., Albany, New York, 1910
Reprinted from Medical News Jan. 14 (1905)

7. Ehrlich, P.
Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung.
Nederlandsch Tijdschrift voor Geneeskunde 5, Eerste
Helft (1909)
8. De Fano, C.
Zelluläre Analyse der Geschwulstimmunitätsreaktion.
Z. Immunitätsforsch. 5: 1 (1910)
9. Thomas, L.
Reactions to homologous tissue antigens.
In: Cellular and humoral aspects of the hypersensitive
states (ed. H.S. Lawrence), p. 539, Cassel, London (1959)
10. Burnet, F.M.
Immunological surveillance in neoplasia.
Transplant. Rev. 7: 3 (1971)
11. Gross, L.
Intradermal immunization of C3H mice against a sarcoma
that originated in an animal of the same line.
Cancer Res. 3: 326 (1943)
12. Foley, E.J.
Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors
in mice of the strain of origin.
Cancer Res. 13: 835 (1953)
13. Prehn, R.T., and Main, J.M.
Immunity to methylcholanthrene-induced sarcoma.
J.Nat.Cancer Inst. 18: 769 (1957)
14. Gorer, P.A.
Some recent work on tumor immunity.
Adv.Cancer Res. 4: 143 (1956)

15. Currie, G.A.
Effector mechanisms in tumor immunity.
In: Cancer and the immune response (ed. E. Arnold)
pp. 36-53, Current Topics in Immunology Series (1974)
16. Baldwin, R.W., and Robins, R.A.
Host immune responses to tumours.
In: Scientific foundations of oncology (eds. T. Symington
and R.L. Carter) pp. 514-520, William Heinemann Medical
Books Ltd., London (1976)
17. Baldwin, R.W., and Robins, R.A.
Induction of tumor-immune responses and their interaction
with the developing tumor.
In: Contemporary topics in molecular immunology (eds. R.R.
Porter and G.L. Ada), Vol. 6, pp. 177-207, Plenum Press,
New York, London (1977)
18. Currie, G.A.
Immunological escape of tumors.
In: Cancer and the immune response, pp. 56-70, Current
Topics in Immunology Series, (ed. E. Arnold) London (1974)
19. Sell, St.
Failure of an immune response to affect tumor growth.
In: Immunology, immunopathology and immunity
pp. 328-350, Medical Department, Harper and Row Pub-
lishers, Hagerstown, Maryland, New York, Evanston, San
Francisco, London (1975)
20. Currie, G.A.
Eighty years of immunotherapy: a review of immunological
methods used for the treatment of human cancer.
Brit.J.Cancer 26: 141 (1972)

21. Carter, St. K.
Immunotherapy of cancer in man.
Am. Scientist 64: 418 (1976)
22. Thomson, D.M.P.
Immunotherapy of cancer.
In: Clinical immunology (eds. S.O. Freedman and Ph.Gold)
pp. 532-573, Medical Department, Harper and Row Publishers,
Hagerstown, Maryland, New York, San Francisco, London
(1976)
23. Alexander, P., and Fairley, H.
Immunotherapy: experimental and clinical aspects.
In: Scientific foundation of oncology (eds. T. Symington
and R.L. Carter), pp. 663-672, William Heinemann Medical
Books, Ltd. London (1976)
24. Donaldson, D.M., and Mitchell, J.R.
Immunization against Ehrlich Ascites Carcinoma with
X-irradiated tumor cells.
Proc.Soc.Exp. Biol. Med. 101: 204 (1959)
25. Bourdon, G., and Halpern, B.
Immunité antitumorale inducté par l'administration de
cellules tumorales homologues et isologues traitées par
un chauffage ménagé.
C.r.hebd. séances acad.sci. 16: 1571 (1976)
26. Wespick, H.T., Kronmann, B.S., Zbar, B., Borsos, T.,
and Rapp, H.J.
Immunotherapy of an intramuscular tumor in strain -2
guinea pigs. Prevention of tumor growth by intradermal
immunization and by systemic transfer of tumor immunity.
J.Nat.Cancer Inst. 45: 377 (1970)

27. Prager, M.D., and Baechtel, F.S.
Methods for modification of cancer cells to enhance
their antigenicity.
Methods in Cancer Research (ed. H. Busch), pp.339-400,
Academic Press, New York (1973)
28. Mitchison, N.A.
Immunologic approach to cancer.
Transplant.Proc. 2: 92 (1970)
29. Sedlacek, H.H., Seiler, F.R., and Schwick, H.G.
Neuraminidase and tumor immunotherapy.
Klin.Wschr. 55: 199 (1977)
30. Naor, D., and Galili, N.
Immune response to chemically modified antigens.
Prog.Allergy 22: 107 (1977)
31. Watkins, J.F., and Chen, L.
Immunization of mice against Ehrlich Ascites Tumor
using a hamster/Ehrlich Ascites Tumor hybrid cell line.
Nature 223: 1018 (1969)
32. Natori, T., Law, L.W., and Appella, E.
Biological and biochemical properties of Nonidet P40-
solubilized and partially purified tumor-specific antigens
of the transplantation type from plasma membranes of a
methylcholanthrene-induced sarcoma.
Cancer Research 37: 3406 (1977)
33. Bowen, J.G., and Baldwin, R.W.
Isolation and characterization of tumor-specific antigens
from the serum of rats bearing transplanted aminoazodye-
induced hepatomas.
Transplantation 21: 213 (1976)

34. Pellis, N.R., Shulan, D.J., and Kahan, B.D.
Specific tumor immunity induced with soluble materials:
Purification of antigens inducing tumor resistance.
Biochem. and Biophys. Res. Comm. 71: 1251 (1976)
35. Coggin, J.H., Jr., Ambrose, K.R., Bellony, B.B., and
Anderson, B.
Tumor immunity in hamsters immunized with fetal tissues.
J. Immunol. 107: 526 (1971)
36. Medawar, P.
In: Immunopotential, pp. 1-2
CIBA Foundation Symposium 18 (new series), Elsevier
Excerpta Medica, North Holland (1973)
37. Coley, W.B.
Contribution to the knowledge of sarcoma
Ann. Surg. 14: 199 (1891)
38. Nauts, H.C.
The apparently beneficial effects of bacterial infections
on host resistance to cancer: end results in 435 cases.
Monograph No. 8, p. 822, New York Cancer Research Institute,
New York (1969)
39. Coley, W.B.
Treatment of malignant tumors by repeated inoculations
of erysipelas, with a report of 10 cases.
Med.Rec. 43: 60 (1893)
40. Coley, W.B.
Treatment of inoperable malignant tumors with toxins of
erysipelas and the Bacillus prodigious.
Am.J.Med. Sci. 108: 50 (1894)

41. Nauts, H.W., Fowler, G.A., and Bogatko, F.H.
A review of the influence of bacterial infection and
of bacterial products (Coley's toxins) on malignant
tumors in man.
Acta Med.Scand. 145 (suppl. 276): 103 (1953)

42. Jacobsen, C.
Der chronische Reiz des Reticuloendothelialen Systems -
eine Krebshemmung.
Arch.Dermatol.Syphilol. 169: 562 (1934)

43. Murphy, J.B.
The lymphocyte in resistance to tissue grafting,
malignant disease, and tuberculous infection.
Monograph Rockefeller Institute Med. Res. 21, (1926)

44. Yashphe, D.J.
Immunological factors in nonspecific stimulation of
host resistance to syngeneic tumors.
Isr.J.Med.Sci. 8: 90 (1971)

45. Tarnowski, G.S.
Approaches to the immunotherapy of experimental tumors
In: Host defense against cancer and its potentiation.
(eds.E. Mizuno et al.), pp. 389-396, University of Tokyo
Press, Tokyo/Univ.Park Press, Baltimore (1975)

46. Green, S., Dobrjansky, A., Chiasson, M.A., Carswell, E.
A., Schwartz, M.K., and Old, L.J.
Corynebacterium parvum as the priming agent in the
production of tumor necrosis factor in the mouse.
J.Nat.Cancer Inst. 59: 1519 (1977)

47. Carswell, E.A. , Old, L.J., Kassel, R.C., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B.
An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.
Proc.Nat.Acad.Sci. 72: 3666 (1975)

48. Green, S., Dobrjansky, A., Carswell, E.A., Kassel, R.C., Old, L.J., Fiore, N., and Schwartz, M.K.
Partial purification of a serum factor that causes necrosis of tumors.
Proc.Nat.Acad.Sci. 73: 381 (1976)

49. Munder, P.G., Modolell, M., Ferber, E., and Fischer, H.
The relationship between macrophages and adjuvant activity.
In: Mononuclear phagocytes (ed. R.van Furth), pp.445-460, Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh (1970)

50. Munder, P.G., Modolell, M., Ferber, E., and Fischer, H.
Phospholipide in quarzgeschädigten Makrophagen.
Biochem. Ztschr. 344: 310 (1966)

51. Munder, P.G., Ferber, E., Modolell, M., und Fischer, H.
Störungen des Phospholipidstoffwechsels von Makrophagen nach Phagozytose von silikogenen Partikeln.
Fortschritte der Staublungenforschung, V. Internationale Staublungentagung 1967 Münster. (Hsg. H. Reploh und H.J. Einbrodt, Niederrheinische Druckerei GmbH, Dinslaken (1967)

52. Munder, P.G., and Lebert, St.
The activation of Phospholipase A in macrophages after the phagocytosis of silica and other cytotoxic dusts.
In: Inhaled Particles IV. (Ed. W.H. Walton), Pergamon Press Oxford and New York, pp. 531-540 (1977)

53. Munder, P.G., Modolell, M., and Fischer, H.
Biochemical studies on adjuvant-treated macrophages.
In: "Non-specific" factors influencing host resistance,
(eds. W.Braun and J.Ungar), pp. 259-266, S. Karger,
Basel (1973)
54. Robertson, J.D., and Lands, W.E.R.
Metabolism of phospholipids in normal and spherocytic
human erythrocytes.
J.Lipid Res. 5: 88 (1964)
55. Munder, P.G.
Biochemische und biologische Untersuchungen zum Wirkungs-
mechanismus von Adjuvantien.
Habilitationsschrift, Universität Freiburg/Brsg. (1973)
56. Langer, W.
Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus immunologischer
Adjuvantien, Dissertation, Universität Freiburg/Brsg. (1973)
57. Munder, P.G., and Modolell, M.
Adjuvant induced formation of lysophosphatides and
their role in the immune response.
Int.Arch.Allergy 45: 133 (1973)
58. Modolell, M., Raetz, W., Munder, P.G., Parant, M., and
Chedid, L.
Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Adjuvantien
in der Gewebekultur. 4. Tagung der Ges.f.Immunologie,
Bern, Abstracta 23, (1972)

59. Munder, P.G., Modolell, M., Raetz, W., and Luckenbach, G.A.
Primary antibody formation in vitro by mouse cells in a complete homologous system.
Eur.J.Immunol. 3: 454 (1973)
60. Munder, P.G., Ferber, E., Modolell, M., and Fischer, H.
The influence of various adjuvants on the metabolism of phospholipids in macrophages.
Int.Arch.Allergy 36: 117 (1969)
61. Stein, Y., and Stein, O.
Metabolism of labelled lysolecithin, lysophosphatidyl-ethanolamin and lecithin in the rat.
Biochim. Biophys. Acta 116: 95 (1966)
62. Arnold, D., Weltzien, H.U., and Westphal O.
Synthesen von Cholinphosphatiden. III. Über die Synthese von Lysolecithinen und ihren Ätheranaloga.
Liebigs Ann. Chem. 709: 234 (1967)
63. Eibl, H.J., and Westphal, O.
Synthesen von Cholinphosphatiden. VI. 3-Palmitoyl-glycerin-1-phosphorylcholin (d- α -lysolecithin) und dessen Unwirksamkeit als Substrat für Acyltransferasen (Lecithin-Synthese)
Liebigs Ann. Chem. 738: 161 (1970)
64. Westphal, O., Fischer, H., and Munder, P.G.
Adjuvantcity of lysolecithin and synthetic analogues.
8th International Congress Biochemistry, Interlaken/Schweiz, 3.-9.9.1970, Abstr. p. 139, Staples Printers, Rochester, England (1970)

65. Munder, P.G., and Modolell, M.
The influence of *Mycobacterium bovis* and *Corynebacterium parvum* on the phospholipid metabolism of macrophages.
Recent Results in Cancer Research 47: 244 (1974)
66. Gisler, R.H., Bussard, A.E., Mazie, J.C., and Hess, R.
Hormonal regulation of the immune response.
I. Induction of an immune response in vitro with lymphoid cells from mice exposed to acute systemic stress.
Cellular Immunology 2: 634 (1971)
67. Loewenthal, H., and Jahn, G.
Übertragungsversuche mit carcinomatöser Mäuseascites-Flüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und chemische Einwirkungen.
Ztschr.f.Krebsforsch. 37: 439 (1932)
68. Roberts, D.C.
Transplanted tumors of rat and mice: an index of tumors and host strains.
Laboratory Animal Handbooks 3, London, Laboratory Animals Ltd. August 1969, pp. 7-10 (1969)
69. Karnofsky, D.A.
Experimental Cancer Chemotherapy
In: The physico-pathology of cancer (ed. F. Homburger and W.H. Fishman), p. 635, Paul B. Hoeber Inc. New York (1953)
70. Sugiura, K.
Tumor transplantation. Methods of animals experimentation
2: 171 (1965)

71. Klein, G., and Révész, L.
Quantitative studies on the multiplication of neoplastic cells in vitro. I. Growth curves of Ehrlich and MC1M ascites tumors.
J.Nat.Cancer Inst. 14: 229 (1953)

72. Potter, M., Fahey, J.L., and Pilgrim, I.
Abnormal serum protein and bone destruction in transmissible mouse plasma cell neoplasm (multiple myeloma).
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 94: 327 (1957)

73. Dunn, Th.B.
Plasma-cell neoplasms beginning in the ileocecal area in strain C3H-mice.
J.Nat.Cancer Inst. 19: 371 (1957)

74. Schwarzacher, H.G., and Wolf, U.
Methods in human cytogenetics. pp. 71-81
Springer Verlag, Berlin (1974)

75. Dalton, A.J., Potter, M., and Merwin, R.M.
Some ultrastructural characteristics of a series of primary and transplanted plasma cell tumors of the mouse.
J.Nat.Cancer Inst. 26: 1221 (1961)

76. Laskov, R., and Scharff, M.
Synthesis, assembly and secretion of gamma globulin by mouse myeloma cells. I. Adaption of the Merwin Plasma cell tumor-11 to culture cloning and characterization of gamma globulin subunits.
J.exp.Med. 131: 515 (1970)

77. Small, D.M., Bourguès, M.C., Dervichian, D.G.
The biophysics of lipid associations.
Biochim.Biophys. Acta 125: 563 (1966)
78. Heidelberger, C., Reznikoff, C.A., and Krahn, D.F.
Malignant transformation of cells in culture using
oncogenic chemicals.
In: Tissue culture, Methods and applications (eds.P.F.
Kruse,Jr. and M.K. Patterson,Jr.) p. 644, Academic Press,
New York (1973)
79. Bausert, W.
Der Einfluß von Überwärmung auf die Immunantwort:
Antikörperbildung von infrarotbestrahlten Mäusen.
Universität Freiburg, Staatsexamensarbeit (1974)
80. Cunningham, A.J., and Szenberg, A.
Further improvements in the plaque technique for
detecting single antibody forming cells.
Immunology 14: 599 (1968)
81. Hallmann, L.
Klinische Chemie und Mikroskopie, pp. 338-343
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1966)
82. Thunold, S.
Local cellular reactions and splenic weight changes
in mice with Ehrlich's ascites carcinoma.
Acta path. et microbiol. scand. 72: 542 (1968)
83. Hartveit, F.
The significance of the blood content of the Ehrlich
ascites carcinoma.
Br.J.Cancer 15: 665 (1961)

84. Lettré, H.
Einige Beobachtungen über das Wachstum des Mäuse-
Ascites Tumors und seine Beeinflussung.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 268 :59 (1941)
85. Dittmar, C.
Über einige chemotherapeutisch bei Impftumoren wirksame
Verbindungen.
Z.Krebsforsch. 49: 515 (1940)
86. Folkman, J.
Tumour angiogenesis.
In: Immunological aspects of cancer (ed.J.E. Castro), pp:
267-282, MTP Press Ltd., Lancaster, England (1978)
87. Hewitt, H.B.
Studies of the dissemination and quantitative trans-
plantation of a lymphocytic leukemia of CBA mice.
Br.J.Cancer 12: 378 (1958)
88. Maruyama, Y., and Knuth, P.
Acceleration of ascites tumour growth rate by serial
transplantation.
Growth 30: 453 (1966)
89. Ehrlich, P., und Apolant, H.
Beobachtungen über maligne Mäusetumoren.
Berliner Klin. Wochenschrift 28: 871 (1905)
90. Hardy, D., and Kotlarski, I.
Resistance of mice to Ehrlich Ascites Tumor after
immunization with live Salmonella enteritidis 11RX.
Aust.J.exp.Biol.med. Sci. 49: 271 (1971)

91. Chedid, L., Lamensans, A., Parant, F., Parant, M., Adam, A., Petit, F., and Lederer, E.
Protective effect of delipidated mycobacterial cells and purified cell walls against Ehrlich carcinoma and a syngeneic lymphoid leukemia in mice.
Cancer Research 33: 2187 (1973)
92. Halpern, B., Frey, A., Crepin, Y., Platica, O., Lorinet, A.M., Rabourdin, A., Sparros, L., and Isac, R.
Corynebacterium parvum, a potent immunostimulant in experimental infections and in malignancies.
In: Immunopotentialiation, pp. 217-234, CIBA Foundation Symposium 18 (new series), Elsevier Excerpta Medica, North Holland (1974)
93. Hager, E.B., Bailey, G.L., Hampers, C.L., and Merrill, J.P.
Immunity against the Ehrlich ascites carcinoma produced by bacterial endotoxins.
Transplant. Proc. 1: 124 (1969)
94. Munder, P.G., Weltzien, H.U., and Modolell, M.
Lysolecithin Analogs: a new class of immunopotentiators VII. Immunopathology Symposion, Bad Schachen
In: Immunopathology (ed. P.A. Miescher), pp. 411-423, Schwabe & Co. Publishers, Basel/Stuttgart (1976)
95. Tarnowski, G.S., Mountain, I.M., Stock, C.C., Munder, P.G., Weltzien, H.U., and Westphal, O.
Effect of lysolecithin and analogs on mouse ascites tumors.
Cancer Research 38: 339 (1978)

96. Arnold, B., Reuther, R., and Weltzien, H.U.
Distribution and metabolism of synthetic ether-deoxy
lysolecithin analogs in mice.
Biochim. Biophys. Acta, im Druck

97. Potter, M., Pumphrey, J.G., and Walters, J.L.
Growth of primary plasmacytomas in the mineral oil
conditioned peritoneal environment.
J.Nat.Cancer Inst. 49: 350 (1972)

98. Berdel, W.E., Bausert, W.R.E., Weltzien, H.U., and
Munder, P.G.
Metastatic growth of Lewis Lung Carcinoma (3LL) under
therapy with lysolecithin analogs and lysolecithin
induced peritoneal cells.
In Vorbereitung

99. Keller, R.
Mononuclear phagocytes and antitumor resistance:
a discussion.
In: The macrophage and cancer, pp. 31-49 (eds. K. James,
B. McBride and ^fA. Stuart) Econoprint, Edinburgh (1977)

100. Arnold, D., and Weltzien, H.U.
Über die strukturabhängige hämolytische Aktivität
einiger Cholin-Phosphatide.
Ztschr.f.Naturforschg. 23b: 665-683 (1968)

101. Weltzien, H.U., Arnold, B., and Reuther, R.
Quantitative studies on lysolecithin-mediated hemolysis.
Use of ether-deoxy lysolecithin analogs with varying
aliphatic chain-lengths.
Biochim. Biophys. Acta 466: 411-421 (1977)

102. Munder, P.G., Fischer, H., Weltzien, H.U., Oettgen, H.F., and Westphal, O.
Lysolecithin analogs: a new class of immunopotentiators with antitumor activity.
Proc.Am.Assoc.Cancer Res. 17: 174 (1976)
103. Roseman, J.
X-ray resistant cell required for the induction of in vitro antibody formation.
Science 165: 1125 (1969)
104. Keller, R.
Cytostatic elimination of syngenetic rat tumor cells in vitro by nonspecifically activated macrophages.
J.exp.Med. 138: 625 (1973)
105. Braun, W., and Shiozawa, C.
Altered cell functions as a consequence of cellular interactions that modify endogenous cyclic AMP levels.
In: "Non-specific" factors influencing host resistance pp. 240-246, (eds. W. Braun and J. Ungar), Karger, Basel (1973)
106. Turk, J.L.
Evidence for a preferential effect of CY on B-cells.
Proc.R.Soc.Med. 66: 805 (1973)
107. Mathé, G., Halle-Pannenko, O., and Bourut, Ch.
Immune manipulation by BCG administered before or after CY for chemo-immunotherapy of L1210 Leukemia.
Eur.J.Cancer 10: 661 (1974)
108. Fischer, B., Wolmark, N., and Saffer, E.
Inhibitory effect of prolonged CP and CY administration on the growth of established tumors.
Cancer 35: 134 (1975)

109. Pritchard, H., and Micklem, H.S.
The nude (Nu/Nu) mouse as a model of thymus and T-lymphocyte deficiency.
In: Proceedings of the first International Workshop on Nude mice (eds. J. Rygaard and C.O. Poulsen), pp 127-139, Fischer Verlag, Stuttgart (1974)
110. Fogh, J., Fogh, J.M., and Orfeo, Th.
One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice.
J.Nat.Cancer Inst. 59: 221 (1977)
111. Keller, R.
Mechanisms by which activated normal macrophages destroy syngeneic rat tumor cells in vitro. Cytokinetics, non-involvement of T lymphocytes, and effect of metabolic inhibitors.
Immunology 27: 285 (1974)
112. Meltzer, M.S.
Tumoricidal responses in vitro of peritoneal macrophages from conventionally housed and germ-free nude mice.
Cellular Immunology 22: 176 (1976)
113. Rao, G.R., Rawls, W.E., Perey, D.Y.E., and Tomkins, W.A.F.
Macrophage activation in congenitally athymic mice raised under conventional or germ-free conditions.
J.Retic. Soc. 21: 13 (1977)
114. Woodruff, M., Dunbar, N., and Ghaffar, A.
The growth of tumors in T-cell deprived mice and their response to treatment with Corynebacterium parvum.
Proc.R.Soc.London B. 184: 97 (1973)

115. Gillette, R.A., and Fox, A.
The effect of T-lymphocyte deficiency and tumor
induction and growth.
Cellular Immunology 19: 328 (1975)
116. Berdel, W., E.
Untersuchungen zum Einfluß von Lysolecithin und
synthetischen Lysolecithin Analoga auf das Wachstum
des Lewis Lungen Karzinoms (3LL) unter besonderer
Berücksichtigung der Metastasierung.
Dissertation, Universität Freiburg i.Br., in Vorbereitung
117. Weinberg, J.B., and Hibbs, J.B. Jr.
Inhibition of macrophage mediated tumor killing by
phagocytized red blood cells and Candida albicans.
J.Retic.Soc. 20: 37a (1976)
118. Morahan, P.S., and Kaplan, A.M.
Macrophage-mediated tumor resistance.
In: Control of neoplasia by modulation of the immune
system (ed. M.A. Chirigos), pp.449-59 Raven Press, N.Y. (1977)
119. Meltzer, M.S., Tucker, R.W., Sanford, K.K., and Leonard,
E.J.
Interaction of BCG-activated macrophages with neoplastic
and nonneoplastic cell lines in vitro: quantitation of
the cytotoxic reaction by release of tritiated thymidine
from prelabelled target cells.
J.Nat.Cancer Inst. 54: 1177 (1975)
120. Hibbs, J.B.Jr., Lambert, L.H.Jr., and Remington, J.S.
In vitro nonimmunological destruction of cells with
abnormal growth characteristics by adjuvant activated
macrophages.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 139: 1049 (1972)

121. Hibbs, J.B. Jr.
Discrimination between neoplastic and nonneoplastic cells in vitro by activated macrophages.
J.Nat.Cancer Inst. 53: 1487 (1974)

122. Hibbs, J.B. Jr.
Role of activated macrophages in nonspecific resistance to neoplasia.
J.Retic. Soc. 20: 223 (1976)

123. Evans, R., and Alexander, P.
Mechanism of extracellular killing of nucleated mammalian cells by macrophages.
In: Immunobiology of the macrophage (ed. D.S. Nelson), pp. 536-576, Academic Press, New York (1976)

124. Alexander, P.
Surveillance against neoplastic cells - is it mediated by macrophages ?
Br.J.Cancer 33: 344 (1976)

125. Lohmann-Matthes, M.L.
Induction of macrophage-mediated cytotoxicity.
In: Immunobiology of the macrophages, (ed. D.S. Nelson) Academic Press, New York, pp. 463 - 486 (1976)

126. Fidler, I.J.
Recognition and destruction of target cells by tumoricidal macrophages.
Israel J. Med. Sci. 14: 177 (1978)

127. Ishii, Y., Yamaoka, H., Toh, K., and Kikuchi, K.
Inhibition of tumor growth in vivo and in vitro by macrophages from rats treated with a streptococcal preparation, OK-432.
Cann 67: 115 (1976)

128. Van Furth, R.
The origin and turnover of promonocytes, monocytes and macrophages in normal mice.
In: Mononuclear Phagocytes (ed. R.van Furth), pp. 151-165, Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, (1970)
129. Blattmann, B.
Untersuchungen in vitro zum Wirkungsmechanismus von Lysophosphatiden auf das Wachstum experimenteller Tumoren. Dissertation, Universität Freiburg/Brsg. (1977)
130. Borgström, B.
Lipid absorption-physicochemical consideration
In: Metabolism and physiological significance of Lipids pp. 221-226 (eds. R.M.C. Dawson and D.N. Rhodes) John Wiley and Sons Ltd., London, New York, Sydney (1964)
131. Ashley, M.P., and Hardy, D.
Tumor resistance of mice infected with Salmonella enteritidis 11RX. The role of peritoneal exsudate cells. Aust.J.exp.Biol.med.Sci. 51: 801 (1973)
132. Halpern, B.N., Biozzi, G., Stiffel, C., and Mouton, D.
Inhibition of tumor growth by administration of killed Corynebacterium parvum.
Nature 212: 853 (1966)
133. Castro, J.E.
Antitumor effects of Corynebacterium parvum in mice. Eur.J.Cancer 10: 121 (1974)

134. Mathé, G., Halle-Pannenko, O., and Bourut, C.
BCG in cancer immunotherapy: results obtained with various BCG preparations in a screening study for systemic adjuvants applicable to cancer immuno-prophylaxe or immunotherapy.
Nat.Cancer Inst.Monogr. 39: 107 (1973)

135. Watanabe, T.
Regression of mouse ascites tumors by the treatment with bacterial extracts.
Japan J.Exp.Med. 36: 453 (1966)

136. Hibbs, J.B. Jr., Taintor, R.R., Chapman, H.A.Jr., and Weinberg, J.B.
Macrophage tumor killing: influence of the local environment.
Science 197: 278 (1977)

137. James, K.
The influence of tumor cell products on macrophage function in vitro and in vivo: a review.
In: The macrophage and cancer, pp. 225-246 (eds. K. James, B. McBride, A. Stuart), Econoprint, Edinburgh (1977)

138. Wheatley, D.N.
Rapid ascites tumor production.
Nature 209: 1255 (1966)

139. Aoki, R., Teller, M.N., and Robitaille, M.-L.
Aging and cancerogenesis. II. Effect of age on phagocytic activity of the reticuloendothelial system and on tumor growth.
J.Nat.Cancer Inst. 34: 255 (1965)

140. Burnet, F.M.
The integrity of the body, p. 179
Harvard University Press (1962)
141. Old, L.J., Clark, D.A., Benacerraf, B., and Goldsmith, M.
The Reticuloendothelial System and the neoplastic process.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 88: 264 (1960)
142. Biozzi, G., Stiffel, C., Halpern, B.N., and Mouton, D.
Etude de la fonction phagocytaire du S.R.E. au cours du
developpement de tumeurs malignes experimentales chez
le rat et la souris.
Ann. Inst. Pasteur 94: 681 (1958)
143. Smith, L.H., and Woodruff, M.F.A.
Comparative effect of two strains of *C. parvum* on
phagocytic activity and tumor growth.
Nature 219: 197 (1968)
144. Old, L.J., Boyse, E.A., Bennet, B., and Lilly, F.
Peritoneal cells as an immune population in transplantation
studies.
In: Cell bound antibodies, (eds. B. Amos and H. Koprowski)
pp. 89-99, Wistar Institute Press, Philadelphia (1963)
145. Keller, R.
Promotion of tumor growth in vivo by antimacrophage agents
J.Nat.Cancer Inst. 57: 1355 (1976)
146. Munder, P.G.
In vitro activation of tumoricidal macrophages by alkyl-
lysophospholipids.
In: Cytotoxic cell interaction and immunostimulation,
(eds. G. Riethmüller and G. Cudkowicz)
Academic Press New York, im Druck

147. Hibbs., J.B. Jr.
The macrophage as a tumoricidal effector cell.
In: The macrophage in neoplasia, pp. 83-112 (ed. M.A. Fink), Academic Press, New York (1976)
148. Baker, P., Weiser, R.S., Jutila, J., Evans, C.A., and Blandau, R.J.
Mechanisms of tumor homografts rejection: the behaviour of sarcoma I ascites tumor in the A/JAX and the C57Bl/6K mouse.
Ann. N.Y. Acad.Sci. 101: 46 (1962)
149. Granger, F.A., and Weiser, R.S.
Homograft target cells: contact destruction in vitro by immune macrophages.
Science 151: 97 (1966)
150. Nelson, D.S.
Macrophages: Perspectives and prospects.
In: Immunobiology of the macrophage, (ed. D.S. Nelson), pp. 617-621, Academic Press, New York (1976)
151. Mackaness, G.B.
The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo.
J.exp.Med. 129: 973 (1969)
152. Hibbs, J.B. Jr.
Heterocytolysis by macrophages activated by Bacillus Calmette-Guérin: lysosome exocytosis into tumor cells.
Science 184: 468 (1974)
153. Munder, P.G., Blattmann, B., Jansen, A.M., and Weltzien, H.U.
In vitro generation of tumor destructive macrophages by alkyllysophospholipids
in Vorbereitung

154. Hibbs, J.B. Jr.
Macrophage nonimmunologic recognition: target cells
factors related to contact inhibition.
Science 180: 868 (1973)
155. Cho, Y., and de Bruyn, P.H.
Destruction of circulating leukemia cells by phagocytosis
in rats with myelogenous leukemia.
J.Nat.Cancer Inst. 60: 185 (1978)
156. Bennett, B., Old, L.J., and Boyse, E.A.
The phagocytosis of tumor cells in vitro.
Transplantation 2: 183 (1964)
157. Rock, C.O., Baker, R.C., Fitzgerald, C., and Snyder, F.
Stimulation of the microsomal alkylglycerol mono-oxygenase
by catalase.
Biochim. Biophys. Acta 450: 469-473 (1976)
158. Snyder, F.
Ether-linked lipids and fatty alcohol precursors in
neoplasms.
In: *Ether Lipids, Chemistry and Biology* (ed. F. Snyder),
pp. 273-296, Academic Press, New York (1972)
159. Snyder, F., Malone, B., and Piantadosi, C.
Tetrahydropteridine-dependent cleavage enzyme for O-alkyl
lipids: substrate specificity.
Biochim. Biophys. Acta 316: 259-265 (1973)
160. Wood, R.
Tumor lipids: Structural and metabolism studies of
Ehrlich Ascites Cells.
In: *Tumor Lipids: Biochemistry and Metabolism* (ed.R.Wood)
pp 139-182, American Oil Chemist Society Press, Champaign,
(1973)

161. Pflieger, R.C., Piantadosi, C., and Snyder, F.
The biocleavage of isomeric glyceryl ethers by soluble liver enzymes in a variety of species.
Biochim. et Biophys. Acta 144: 633 (1967)
162. Andreessen, R., Weltzien, H.U., Eibl, H.J., Common, H.H., Löhr, G.W., and Munder, P.G.
Selective destruction of human leukemic cells by alkyllysophospholipids.
Cancer Research, im Druck
163. Poole, A.R., Howell, J.I., and Lucy, J.A.
Lysolecithin and cell fusion.
Nature 227: 810 (1970)
164. Burnet, F.M.
Evolution of the immune process in vertebrates
Nature 218: 426 (1968)
165. Manning, M.J., and Turner, R.J.
The immune system.
In: *Comparative Immunobiology*, p. 2, pp. 167-173
(eds. M.J. Manning and R.J. Turner), Blackie, Glasgow (1976)
166. Jenkin, C.R.
Factors involved in the recognition of foreign material by phagocytic cells from invertebrates.
In: *Comparative Immunology*, (ed. J. Marchalonis), pp. 80-97
Blackwell Scientific Publications Oxford (1976)
167. Rabinovitch, M.
Phagocytic recognition.
In: *Mononuclear Phagocytes* (ed. R. van Furth), pp. 229-313,
Blackwell Scientific Publication Oxford (1970).

168. Rygaard, J., and Poulsen, C.O.
The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumors.
Acta pathol. Microbiol. Scand.Sect.B 82: 99 (1974)
169. Bang, F.B.
A survey of phagocytosis as a protective mechanism against
disease among invertebrates.
In: "Non-specific" factors influencing host resistance
(Eds. W. Braun and J. Ungar), pp. 2-10, S. Karger, Basel (1973)
170. Saunders, J.W., Jr.
Death in embryonic system.
Science 154: 604 (1966)
171. Nelson, D.S.
Macrophages and the phylogenetic development of adaptive
immunological responses.
In: Macrophages and Immunity (ed. D.S. Nelson), pp. 305-15
North Holland Publishing Company, Amsterdam, London (1969)
172. Valdimarsson, H.
Immunity and immunity deficiency.
In: The immune system - a course on the molecular and
cellular basis of immunity (eds. M.J. Hobarz and I.
McConnell) pp. 317-332, Blackwell Scientific Publications,
Oxford (1975)
173. Brund, M.J., and Raffel, S.
Macrophage processing of antigen for induction of tumor
immunity.
Cancer Res. 37: 1838 (1977)

174. Prehn, R.T.
Do tumors grow because of the immune response of
the host ?
Transplant. Rev. 28: 34 (1976)
175. Prehn, R.T.
Tumor progression and homeostatis: immunostimulation
of tumor growth.
Adv. Cancer Res. 23: 228 (1976)

Lebenslauf

Am 2. Juni 1948 in Konstanz als Sohn des Elektromeisters
Robert Bausert und seiner Ehefrau Charlotte,
geb. Burkhardt, geboren.

1955 - 1959	Volksschule in Konstanz
1959 - 1968	Math.-Nat. Gymnasium in Konstanz, Abiturabschluß
ab Winter 1968	Studium der Biologie und Leibesübungen an der Universität Freiburg i.Br.
Winter 1972	Staatsexamen in Leibesübungen (Universität Freiburg i.Br.)
Frühjahr 1973	Staatsexamen in Biologie (Universität Freiburg i. Br.)
Juli 1973 - Januar 1974	Staatsexamensarbeit am Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg i.Br.
ab März 1974	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg i.Br.

